

Tesis presentada para optar el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

**Mecanismos fisiológicos que determinan la merma de crecimiento de *Populus deltoides* infectado por roya (*Melampsora medusae*).**

Fermín Gortari, Ingeniero Forestal

Directora: Dra. Corina Graciano

Co-director: Dr. Juan José Guiamet

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE (CONICET-UNLP)

Fecha de presentación: 9 de Noviembre de 2015

## **Agradecimientos.**

A Corina Graciano, mi directora, por haber confiado en mí y proponerme el desafío. Por su tiempo, por su entusiasmo, por su dedicación, por darme la libertad de pensar y de hacer, por respetar mis ideas, por exigirme, por educarme, por tanto más.

A Juan José Guiamet, mi codirector, por su aporte crítico e inventar tiempo para corregir y aclarar ideas de esta tesis.

A Silvia Cortizo, de INTA EEA Delta del Paraná, quien es la persona que comenzó con el abordaje fisiológico sobre este tema en Argentina y compartió desinteresadamente sus conocimientos.

A Laura Faustino quien sin darse cuenta me demostró que ser becario y realizar una tesis doctoral era una experiencia que bien valía la pena. También, por su ayuda y tiempo desde mi primer día en el INFIVE.

A Santiago Martínez por su predisposición y polifuncionalidad. De realizar preparados para el microscopio pasamos a tamizar raíces o incluso apeaar árboles.

A Facundo Gómez por su predisposición y tiempo invertido en ajustar las técnicas para HPLC. También, junto con Gustavo Gergoff, rescatarme cuando se me complicaba con el equipo.

A Emilia Rodríguez por compartir su experiencia y ayudarme a resolver problemas al ser coetáneos en temas relacionados a los álamos, además de colaborar en varias de las mediciones.

A Javier Alvarez, Fabio Achinelli y Virginia Luquez por compartir sus ideas, experiencia y conocimientos sobre los álamos.

A Lorenza Costa por su colaboración y mirada bioquímica, la cual me permitió resolver varios inconvenientes que se fueron presentando con las técnicas empleadas (entre ellos la determinación de proteínas).

A Cecilia Gortari por compartir sus conocimientos, observaciones personales e incluso reactivos relacionados a la determinación de glucosamina. También, junto a Mario Saparrat,

aclararme en cuestiones de microbiología. A Mariela Bayardo por su ayuda en dichas determinaciones.

A Mónica Murace por confiar y permitirnos ir compartiendo algunos de los resultados obtenidos con los alumnos de la cátedra de Protección Forestal y en el primer encuentro de Sanidad Forestal organizado por la cátedra.

A Eduardo Tambussi por sus aportes relacionados a la fotosíntesis y al uso del IRGA.

A la estación experimental Ing. Agr. Julio Hirschhörn y a su personal. Particularmente a su director Roberto Barreyro y Pablo Etchevers por darnos lugar para realizar parte de los ensayos, realizar las tareas silviculturales y responder inmediatamente a nuestras solicitudes.

Al CONICET por confiar en mí y becarme durante 5 años permitiendo llevar a cabo esta tesis. A los proyectos PICT 00487 y PIA 12028 por el financiamiento para la realización de los ensayos y determinaciones.

A mis compañeros y amigos del INFIVE (Emi, Anita, Pepe, Diego, Cristian, Facu, Nadia, Nico, Maru, Diana, Lujan, Mariana, Santi, Analía, Ali, Lucia, Ines, Ale, Agus...) porque charlar y distenderse fue parte más que importante de esta tarea.

## Índice de contenidos.

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract. ....</b>	<b>4</b>
<b>Trabajos derivados de esta tesis. ....</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo 1: Introducción. ....</b>	<b>9</b>
<b>1.1-Asociaciones entre plantas y microorganismos. ....</b>	<b>10</b>
1.1.1- Las royas.....	11
<b>1.2- Asociación entre los álamos y roya. ....</b>	<b>12</b>
1.2.1- La roya del álamo.....	12
1.2.2- Los álamos.....	13
1.2.3- Asociación roya-álamos. ....	13
1.2.4- Alteraciones producidas por roya en álamos. ....	14
1.2.5- Epifitias.....	15
<b>1.3- La producción de Álamos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4- Limitaciones abióticas de la producción de álamo. Estrés hídrico.....</b>	<b>17</b>
1.4.1- Interacción entre factores abióticos y bióticos. Roya y estrés hídrico. ....	18
<b>1.5- Objetivos e hipótesis. ....</b>	<b>21</b>
1.5.1- Objetivo general.....	21
1.5.2- Objetivos particulares. ....	21
<b>1.6- Organización de la tesis. ....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo 2: Alteraciones en el crecimiento. ....</b>	<b>25</b>
<b>2.1- Introducción.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2- Objetivos e hipótesis. ....</b>	<b>28</b>
<b>2.3- Materiales y métodos.....</b>	<b>29</b>
2.3.1- Determinación del agente causal de la roya, en los clones utilizados, en la ciudad de La Plata. ....	29
2.3.2- Ensayo 1. ....	29
2.3.3- Ensayo 2. ....	32
2.3.4- Análisis estadístico y presentación. ....	33
<b>2.4- Resultados. ....</b>	<b>34</b>
2.4.1- Determinación del agente causal.....	34

2.4.2- Ensayo 1. ....	34
2.4.3- Ensayo 2. ....	38
<b>2.5- Discusión. ....</b>	<b>43</b>
<b>2.6- Conclusiones. ....</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo 3: Alteraciones en la fisiología de la hoja. ....</b>	<b>49</b>
<b>3.1-Introducción. ....</b>	<b>50</b>
<b>3.2- Objetivos e hipótesis. ....</b>	<b>53</b>
<b>3.3-Materiales y métodos. ....</b>	<b>54</b>
3.3.1- Ensayos.....	54
3.3.2- Mediciones fisiológicas. ....	54
3.3.3- Análisis estadístico y presentación. ....	56
<b>3.4- Resultados. ....</b>	<b>57</b>
3.4.1- Ensayo 1. ....	57
3.4.2- Ensayo 2. ....	60
3.4.3- Relación entre los cambios en los parámetros medidos y el nivel de infección.....	66
<b>3.5-Discusión. ....</b>	<b>68</b>
<b>3.6-Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
<b>Capítulo 4: Alteraciones en la retraslocación de nutrientes. ....</b>	<b>73</b>
<b>4.1-Introducción. ....</b>	<b>74</b>
<b>4.2- Objetivos e hipótesis. ....</b>	<b>76</b>
<b>4.3- Materiales y métodos.....</b>	<b>77</b>
4.3.1- Ensayos.....	77
4.3.2- Determinaciones de N, proteínas y glucosamina. ....	77
4.3.3- Análisis estadístico y presentación. ....	78
<b>4.4- Resultados. ....</b>	<b>79</b>
<b>4.5- Discusión. ....</b>	<b>89</b>
<b>4.6- Conclusiones. ....</b>	<b>94</b>
<b>Capítulo 5: Interacción entre estrés hídrico y roya. ....</b>	<b>95</b>
<b>5.1- Introducción.....</b>	<b>96</b>
<b>5.2- Objetivos e hipótesis. ....</b>	<b>98</b>
<b>5.3- Materiales y métodos.....</b>	<b>99</b>
5.3.1- Ensayo 3 (temporada 2011-2012).....	99
5.3.2- Ensayo 4 (temporada 2013-2014).....	100
5.3.3- Análisis estadístico y presentación. ....	101

<b>5.4- Resultados.</b>	<b>103</b>
5.4.1- Ensayo 3: Caracterización de los tratamientos hídricos.	103
5.4.2- Ensayo 3: Cambios en el crecimiento debido a la interacción entre defoliación y estrés hídrico.	104
5.4.3- Ensayo 3: Cambios en la dinámica de los nutrientes debido a la interacción entre la defoliación y el estrés hídrico.	108
5.4.4- Ensayo 4. Interacción entre roya y estrés hídrico. Evolución de la roya y cambios asociados a nivel foliar.	114
<b>5.5- Discusión.</b>	<b>121</b>
5.5.1- Caracterización de los tratamientos hídricos.	121
5.5.2- Cambios en el crecimiento y en la dinámica de nutrientes debido a la interacción entre defoliación y el estrés hídrico.	122
5.5.3- Interacción entre roya y estrés hídrico. Evolución de la roya y cambios asociados a nivel foliar.	126
<b>5.6- Conclusiones.</b>	<b>128</b>
<b>Capítulo 6: Consideraciones finales.</b>	<b>129</b>
6.1- Discusión general.	130
6.2- Contraste de hipótesis.	133
6.3- Conclusión final.	137
<b>Anexo 1: Figuras complementarias.</b>	<b>138</b>
A1.1- Figuras complementarias al capítulo 3.	139
A1.2- Figuras complementarias al capítulo 4.	141
<b>Anexo 2: Metodologías alternativas para la cuantificación de roya.</b>	<b>143</b>
A2.1- Introducción.	144
A2.2- Objetivo e hipótesis.	145
A2.3- Materiales y métodos.	145
A2.4- Resultados comentados.	147
A2.5- Conclusiones.	149
<b>Capítulo 7: Bibliografía.</b>	<b>151</b>

## Resumen.

Las plantas establecen estrechas relaciones con algunos microorganismos. Particularmente las royas establecen una asociación considerada parasítica, obteniendo del hospedante nutrientes y compuestos carbonados. Como consecuencia de este parasitismo se observan pérdidas de rendimiento en los cultivos asociadas a un desmantelamiento del aparato fotosintético por un lado y un aumento de ciertas rutas biosintéticas de defensa por el otro.

La roya de los álamos es considerada una de las enfermedades más importantes del género *Populus* en Argentina como también a nivel mundial. Esta enfermedad ha obligado al remplazo de materiales genéticos utilizados en diferentes áreas productoras de álamo. Sin embargo, las alteraciones producidas por esta enfermedad no han sido abordadas desde un enfoque fisiológico integrador. La magnitud de estas alteraciones no sólo depende de la especie de álamo y del microorganismo causante de la roya, sino que también de las condiciones ambientales en las que se produce dicha asociación.

Bajo estas consideraciones, se planteó como objetivo general conocer los mecanismos fisiológicos que determinan la merma en el crecimiento de *Populus deltoides* por la infección por roya (*Melampsora medusae*). Para ello, se trabajó con dos clones de álamo que presentaban “a priori” una susceptibilidad diferencial a la roya (clon Onda y clon ‘Australiano 106/60’). Se realizaron ensayos en contenedores como también a campo. Se evaluaron las alteraciones producidas por roya en el crecimiento de las plantas (altura de la planta, diámetro del tallo y acumulación de biomasa), densidad básica de la madera, variables fisiológicas a nivel foliar (fotosíntesis neta, respiración, tasa de transporte de electrones y rendimiento cuántico del fotosistema II, contenido de clorofilas, conductancia estomática y conductividad hidráulica de la hoja) y en la dinámica de nutrientes. También se estudiaron las alteraciones producidas por la roya bajo diferentes condiciones ambientales, como lo son suelos con diferente disponibilidad de nitrógeno y estrés hídrico (sequía e inundación).

En esta investigación se determinó que la roya produce una reducción en el crecimiento de las plantas de ambos clones en condiciones de campo, como también en condiciones controladas. La magnitud de la alteración depende del clon. La disminución en la densidad básica de la madera sólo se produce en el clon Onda.

La reducción en el crecimiento producida por roya puede ser explicada como una consecuencia de las alteraciones producidas en la fisiología de la hoja. La roya produce una reducción en la fotosíntesis neta debido a una pérdida de integridad del aparato fotosintético (tasa de transporte de electrones y rendimiento cuántico del fotosistema II, contenido de clorofilas). Al mismo tiempo, hay un aumento de la respiración. Sin embargo, esta reducción en la fotosíntesis neta es anterior a la pérdida de integridad, posiblemente porque la infección y desarrollo del hongo reduce el intercambio gaseoso (menor conductancia estomática) y la integridad del mesófilo (menor conductividad hidráulica de la hoja). Independientemente del clon, al aumentar la severidad de la enfermedad las alteraciones fisiológicas a nivel de hoja son mayores.

Las hojas que son afectadas por la roya caen anticipadamente y lo hacen con una concentración mayor de nutrientes, los cuales son retenidos por el hongo o en metabolitos que no son removilizados antes de la abscisión foliar. De esta forma, los contenidos de nutrientes y proteínas en los tejidos de reserva de la planta se reducen, principalmente como consecuencia de la reducción en el crecimiento. Sin embargo, en el clon Onda también se produce una reducción en la concentración de nutrientes.

La mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo, si bien produjo un aumento del crecimiento y de las concentraciones de este nutriente en los tejidos de reserva de la planta, no modificó los niveles de severidad de la enfermedad. No existió interacción con la roya, por lo que la reducción en crecimiento y las alteraciones en la fisiología causadas por la roya fueron de similar magnitud bajo las diferentes disponibilidades de nitrógeno.

Cuando la roya se evaluó bajo diferentes condiciones hídricas, se observó que existe interacción entre la enfermedad y la disponibilidad de agua para el crecimiento de la planta. El desarrollo de la enfermedad es mucho mayor cuando las plantas crecen con buena disponibilidad de agua, se reduce bajo sequía y es mínimo en condiciones de inundación. La misma tendencia se observa en ambos clones, sin embargo, en el clon Onda las diferencias son más evidentes. Como consecuencia, la caída anticipada de hojas y el daño en el aparato fotosintético producidos por la enfermedad son mayores en las plantas a capacidad de campo, se vuelven mínimos cuando las plantas están bajo sequía y no se observan en las plantas inundadas.

Estas alteraciones en la fisiología de las hojas producen efectos similares en el crecimiento a una defoliación artificial del 50%. En este caso, la mayor reducción del



crecimiento se manifiesta en las plantas que crecen a capacidad de campo, es mínima en plantas bajo sequía y nula en plantas inundadas.

La conclusión final es que la roya afecta la fisiología de la hoja desde el inicio de la infección porque reduce el intercambio gaseoso. A medida que la enfermedad se desarrolla, se produce daño en el aparato fotosintético y la posterior abscisión foliar. Las hojas que caen lo hacen con mayor concentración de nutrientes y por lo tanto se reduce la acumulación de los mismos en los tejidos de reserva de la planta. Como consecuencia de estos procesos el crecimiento se reduce, aunque en diferente magnitud dependiendo del clon y de las condiciones ambientales. Por ejemplo, bajo los efectos de la inundación la roya no produce pérdidas de crecimiento y son mínimas cuando las plantas sufren estrés por sequía.

La información derivada de esta tesis puede aportar conceptos importantes para la evaluación de mecanismos de control químico de la enfermedad, por ejemplo, tener en cuenta las condiciones ambientales para recomendar o no la aplicación de fungicidas. Por otro lado, en los planes de mejoramiento genético que tengan como objetivo encontrar genotipos más tolerantes a la inundación o a la sequía, sería poco relevante considerar la susceptibilidad a la roya.

Finalmente, esta tesis aporta una evaluación fisiológica integral del patosistema álamo-roya que incluye evaluaciones a distintas escalas (desde hoja hasta plantación) que dan sustento a las investigaciones que se realizan a niveles menores de integración (genómica, proteómica y metabolómica).

Palabras claves: *Populus deltoides*, álamo, *Melampsora medusae*, roya, crecimiento, densidad básica de la madera, fisiología foliar, dinámica de nutrientes, estrés hídrico.

## Abstract.

Plants establish close relationships with microorganism. Particularly, rusts have a parasitic association with plants, because they obtain nutrients and carbonate compounds from the host. In consequence, yield losses are observed in diseased plants associated with the breakdown of the photosynthetic apparatus and an increase in certain defense biosynthetic pathways.

Poplar rust is considered one of the most important diseases on *Populus* genus in Argentina and around the world. This disease has forced to the replacement of genetics materials used for plantations in different areas. However, the alterations produced in the plants by rust have not been studied from a physiological integrated point of view. The magnitude of the alterations in the plants does not depend only on the poplar clone and rust species, but also on the environmental conditions in which the association happens.

The general objective of this Thesis was to know the physiological mechanisms that determinate the growth decline on *Populus deltoides* infected by rust (*Melampsora medusae*). For this, we worked with two poplar clones that “a priori” have differential susceptibility to rust (clone Onda and clone ‘Australiano 106/60’). Containers and field experiments were performed. Alterations on growth (plant height, stem diameter and biomass accumulation), wood basic density, physiological variables at leaf level (net photosynthesis, respiration, photosystem II electron transport rate and quantum yield, chlorophylls content, stomatal conductance and leaf hydraulic conductance) and nutrients dynamic caused by rust were evaluated. It was also studied the alterations produced by rust under different environmental conditions, like different nitrogen availability in the soil and water stress (drought and flooding).

Rust diminished growth on plants of both clones on field and controlled conditions. The magnitude of the reduction was clone-dependent. Only on clone Onda, wood basic density was lower in diseased plants. Growth decrease can be explained as a consequence of leaf physiology alterations. The net photosynthesis drop was due to the loss of photosynthetic apparatus integrity (reduction of photosystem II electron transport rate and quantum yield and chlorophylls content). At the same time, rust increased respiration. However, the net photosynthesis reduction started previously to the loss of integrity, possibly because the

fungus infection and development reduced gas exchange (lower stomatal conductance) and the mesophyll integrity (lower leaf hydraulic conductance). As the disease severity increased the physiological alterations at leaf level were higher, independently of the clone.

Leaves affected by rust fell earlier in autumn and with higher nutrient concentration than healthy leaves. Nutrients were retained by the fungus biomass or in plant metabolites that were not remobilized before leaf abscission. Thus, nutrients and proteins content on plant storage tissues (stems and roots) were reduced in infected plants of both clones. However, nutrient concentration reduction in stems and roots was observed only on clone Onda.

Higher nitrogen availability on the soil increased growth and concentration of this nutrient on plant storage tissues. However, disease severity levels were not altered. Therefore, growth decline and physiology alterations caused by rust under different nitrogen availability were similar.

When rust was evaluated under different water conditions, interaction between rust and water availability for plant in the soil was observed. Disease development was much higher when plants grew with good water availability, it was lower under drought and it was minimal under flooding conditions. The same trend was observed in both clones. However, differences were more evident on clone Onda. As a consequence, anticipated defoliation and photosynthetic apparatus damaged produced by rust were higher on plants at field capacity, were minimal under drought and were not observed on flooding plants.

The leaf physiology alterations produced by rust had similar effect on growth than an artificial 50% defoliation. On this occasion, the higher growth reduction occurred on plants growing at field capacity, followed by plants under drought and was minimal in flooding plants.

The final conclusion is that rust affects leaf physiology from the beginning of the infection because it reduces gas exchange. As disease develops, damage on photosynthetic apparatus and the subsequent leaf abscission happen. Leaves fall with higher nutrient concentration and hence, the accumulation of nutrients on plant storage tissues is reduced. Growth is reduced as a consequence of this process, even though with different magnitude depending on the clone and environmental conditions. For example, rust do not produce growth losses under flooding and it is minimal when plants suffer drought.

The information derived from this thesis can provide important concepts for the evaluation of chemical control mechanisms of the disease, for example, that environmental conditions should be taken into account to suggest or not the fungicide application. On the

other hand, on genetics improvement programs that look for more tolerant to flooding or drought genotypes it would be of little relevance to consider rust susceptibility.

Finally, this Thesis brings a comprehensive physiological assessment of poplar-rust pathosystem that includes different scales evaluations (from leaf to plantation) and gives sustenance to researches at lower levels of organization (genomics, proteomics and metabolomics).

Keywords: *Populus deltoides*, poplar, *Melampsora medusae*, rust, growth, wood basic density, leaf physiology, nutrients dynamic, water stress.

## **Trabajos derivados de esta tesis.**

**2010.** Gortari Fermín, Graciano C. Cortizo S. y Guiamet J. J. Disminución en la fotosíntesis en álamos infectados por roya. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. La Plata, Argentina.

**2012.** Gortari Fermín, Graciano C. y Guiamet J. J. Cambios hidráulicos en hojas de álamo debido a la infección por roya. XXV Reunión Argentina de Ecología. Luján, Argentina.

**2012.** Gortari Fermín, Graciano C. y Guiamet J. J. Cambios en la acumulación de materia seca en álamo debido a la interacción entre la infección por roya y el estrés hídrico. XXIX Reunión Argentina de fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina.

**2013.** Gortari Fermín, Graciano C. y Guiamet J. J. Cambios en el crecimiento y la dinámica de nutrientes de *Populus deltoides* Batr. infectado por roya (*Melampsora medusae*). IV Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Iguazú, Argentina.

**2013.** Gortari Fermín y Graciano C. Efectos fisiológicos de la roya en las salicáceas. I Encuentro de Sanidad Forestal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Argentina. Exposición oral.

**2014.** Gortari Fermín, Cortizo S., Guiamet J. J. y Graciano C. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre el impacto de la roya en la fisiología y crecimiento del álamo. IV Congreso Internacional de las Salicáceas en Argentina. La Plata, Argentina.

**2014.** Gortari Fermín, Graciano C. y Guiamet J. J. Daño en la integridad del fotosistema II en diferentes clones de álamo, debido a la combinación de roya y estrés hídrico. XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina. Exposición oral ([www.youtube.com/watch?v=nH\\_OxdeKxI](http://www.youtube.com/watch?v=nH_OxdeKxI)).

**2015.** Gortari Fermín, Rodríguez M. E., Martínez S., Cortizo S. y Graciano C. Cambios en el crecimiento y la densidad de la madera en dos clones de álamo (*Populus deltoides*) debidos a

la infección con roya (*Melampsora medusae*). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Volumen 114.

## Capítulo 1: Introducción.

## 1.1-Asociaciones entre plantas y microorganismos.

Las plantas crecen rodeadas de microorganismos, estableciéndose en muchos casos asociaciones estrechas entre ambos. Estas asociaciones, en un sentido amplio, se denominan simbiosis (Parniske, 2000). La simbiosis puede ser mutualista (tanto el hospedero como el hospedante se ven favorecidos), comensalista (uno obtiene un beneficio mientras que el otro no se perjudica ni obtiene beneficios) o parasítica (uno se beneficia de la asociación mientras que el otro es perjudicado) (Redman *et al.*, 2001).

Una simbiosis del tipo mutualista puede darse a nivel radical entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas. De esta asociación, las plantas se ven favorecidas con una mayor disponibilidad de nitrógeno y en contrapartida, aportan a las bacterias compuestos carbonados (Kneip *et al.*, 2007). Otro ejemplo de simbiosis mutualistas son los hongos formadores de micorrizas. En esta asociación, los hongos facilitan la absorción de fósforo para las plantas y reciben de éstas compuestos carbonados. Además, está comprobado que de estas asociaciones las plantas se ven beneficiadas en otros aspectos, por ejemplo evitan la absorción de metales pesados, mejoran las relaciones hídricas y mejoran las defensas contra herbívoros y hongos patógenos (Newsham *et al.*, 1995). De la simbiosis entre álamos y hongos micorrízicos se observan aumentos en la biomasa y supervivencia de las plantas (Danielsen *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2013), debido a una mayor acumulación de nutrientes (P, S, K, Ca y Mg) (Danielsen & Polle, 2014), mayor tolerancia al estrés hídrico (Danielsen & Polle, 2014), mayor tolerancia a metales pesados (Ma *et al.*, 2014) o enfermedades (Pfabel *et al.*, 2012). También es posible encontrar este tipo de simbiosis en los tejidos aéreos. Existe mutualismo entre los pastos (subfamilia *Poideae*) y el endófito *Epichloe* sp. que otorga al hospedante resistencia a herbívoros y a la sequía (Schardl, 2010). También en álamos se encontró que la presencia de endófitos mejora la resistencia de la planta a enfermedades (Raghavendra & Newcombe, 2012).

La clasificación de las simbiosis como mutualistas o parasíticas no excluye la existencia de un continuo desde el mutualismo al parasitismo (Johnson *et al.*, 1997; Paszkowski, 2006). Una asociación que bajo ciertas circunstancias se comporta como mutualista puede llegar a ser parasítica cuando las condiciones cambian y viceversa. Las asociaciones entre pastos y *Epichloe* sp. (que normalmente se consideran mutualistas) pueden volverse parasíticas bajo ciertas circunstancias, como suelos pobres en nutrientes (Ahlholm *et al.*, 2002; Lehtonen *et al.*, 2005).



Lo mismo ocurre con las asociaciones entre plantas y hongos formadores de micorrizas. Cuando se establece la asociación planta-micorriza en suelos pobres en nutrientes dicha asociación es mutualista, mientras que cuando la asociación se establece en suelos ricos en nutrientes (o ambientes con baja disponibilidad de luz), la relación se vuelve parasítica o al menos comensalista (Johnson *et al.*, 1997).

Los casos más claros de simbiosis, donde uno de los componentes se beneficia y el otro se ve perjudicado son aquellos en donde se establece una relación entre plantas y hongos parasíticos, como los oídios y las royas. En estos caso son los hongos los que se benefician de la asociación, ya que a través de estructuras especializadas obtienen del hospedante nutrientes y compuestos carbonados (Voegelé & Mendgen, 2003). La asociación entre *Quercus robur* y *Erysiphe* sp. produce pérdida en el crecimiento y afecta la regeneración de *Q. robur* (Desprez-Loustau *et al.*, 2014; Marcais & Desprez-Loustau, 2013). Pérdidas de crecimiento, y como consecuencia, del rendimiento se manifiestan para otras asociaciones entre plantas y oídios como *Mangifera indica*-*Pseudoidium anacardii* (Nasir *et al.*, 2014) y *Triticum aestivum*-*Blumeria graminis* (Green *et al.*, 2014).

### 1.1.1- Las royas.

Las royas constituyen un grupo de enfermedades producidas por hongos que se encuentran ampliamente distribuidos en diversas especies de plantas, y producen daños sobre la mayoría de los cultivos. El daño más evidente es pérdida de rendimiento de los cultivos. La disminución del rendimiento está reportada para varias especies, pudiendo mencionar a: *Phaseolus vulgaris* con la roya producida por *Uromyces appendiculatus* (González & García, 1996; Velez-Martinez *et al.*, 1989) o *Uromyces phaeoli* (Velez-Martinez *et al.*, 1989), *Avena sativa* con *Puccinia graminis* (Mir *et al.*, 2004), *Zea mays* con *Puccinia sorghi* o *Puccinia polysora* (Formento, 2010), *Glicine max* con *Phakopsora pachyrhizi* o *Phakopsora meibomia* (Ivancovich & Botta, 2003). Estas pérdidas de rendimiento se deben a que la presencia de la roya produce un desmantelamiento del aparato fotosintético por un lado, y un aumento de la actividad de rutas biosintéticas de compuestos de defensas, por otro. Prueba de esto es que cuando las hojas están infectadas con roya existe una disminución en la fotosíntesis neta (Bassanezi *et al.*, 2001; Carretero *et al.*, 2011; Toome *et al.*, 2009), en el contenido de clorofila (Honorato Júnior *et al.*, 2015), el rendimiento cuántico del fotosistema II (Alves *et al.*, 2011; Bassanezi *et al.*, 2002) y en la conductancia estomática (Toome *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011).

Al mismo tiempo aumenta la respiración (Carretero *et al.*, 2011) y la emisión de compuestos volátiles (Toome *et al.*, 2009).

Con el avance de la infección, el hongo se torna un destino de nutrientes y al caer las hojas anticipadamente, los mismos quedan retenidos en la masa fúngica perdiéndose para las plantas (Cortizo, 2014; Van Den Berg *et al.*, 2007). De esta forma se reduce la acumulación de nutrientes en los tejidos de reserva y la retranslocación de nutrientes a tejidos jóvenes en formación.

## **1.2- Asociación entre los álamos y roya.**

### **1.2.1- La roya del álamo.**

La roya de álamo hace referencia a un grupo de enfermedades que puede ser producida por varios hongos (13 especies y 2 híbridos) pertenecientes al género *Melampsora* (Pei & Shang, 2005). Se caracterizan por presentar un ciclo de vida muy complejo sobre varios hospedantes, es decir, son macrocíclicas y heteroicas. El ciclo completo consta de cinco estadios, el cual comienza cuando las teleutosporas (estadio teleutospórico,  $n+n$ ) que quedaron en las hojas caídas en el otoño dan lugar a las basidiosporas (estadio basidiospórico,  $n$ ) las cuales infectan al hospedante alternativo. Luego le suceden las picniosporas (estadio picniospórico,  $n$ ), las cuales forman hifas de diferente polaridad que se fusionan dando origen a las eciosporas (estadio esciospórico,  $n+n$ ). Estas eciosporas son las que infectan las hojas de los álamos, donde aparecen las urediniosporas (estadio urediniospórico,  $n+n$ ). Estas urediniosporas dan lugar a ciclos reiterados de producción de urediniosporas hasta que las condiciones ya no son favorables y se producen teleutosporas, como forma de pasar el invierno.

En Argentina, el ciclo de la roya es más simple, sólo se presentan los estadios urediniospóricos y teleutospóricos. En este caso, el ciclo comienza cuando las urediniosporas que quedaron en las hojas caídas de la temporada anterior y posiblemente en las yemas de las plantas, infectan hojas nuevas durante la primavera. Producto de esta infección se producen más urediniosporas hasta que las condiciones climáticas son desfavorable (Cortizo, 2005). Si bien llegan a formarse teleutosporas al final de la temporada las mismas solo son viables en un bajo porcentaje luego del otoño.

### 1.2.2- Los álamos.

El género *Populus* es originario del hemisferio norte (sólo el *Populus euphratica* y el *Populus ilicifolia* tienen un pequeño ingreso en el hemisferio sur) y comprende cerca de unas 30 especies a las que deben agregarse numerosos híbridos naturales o logrados por el hombre (Dickmann, 2001), aunque es preciso hacer notar que algunas clasificaciones elevan el número de especies hasta aproximadamente las 100 (Eckenwalder, 1996; Pei & Shang, 2005). Son especies caducifolias, dioicas y presentan un tallo principal poco ramificado con hojas simples (Dickmann, 2001). En Argentina y en la gran mayoría de las plantaciones a nivel mundial se cultiva *Populus nigra* L., *Populus deltoides* Marsh. y sus híbridos (*P. nigra* x *P. deltoides* (*P. x canadensis* anteriormente *P. euroamericana*)) llamados “euroamericanos” (Borodoski, 2006).

### 1.2.3- Asociación roya-álamos.

Entre los estreses bióticos, la roya es considerada una de las enfermedades más importantes que afecta al género *Populus*, tanto en Argentina como en el resto del mundo (Tabor *et al.*, 2000). Si bien el número de especies dentro del género *Melampsora* es muy amplio, como también lo son las especies dentro del género *Populus*, algunas asociaciones son muy específicas. Una de tales asociaciones se produce entre *Populus deltoides* y *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae* y otro es la que se establece entre *Populus tremuloides* y *Melampsora medusae* f. sp. *tremulae* (Vialle *et al.*, 2013). Los híbridos de *Populus deltoides* pueden llegar a interaccionar con otras especies de roya (Frey *et al.*, 2005; Newcombe *et al.*, 2000).

Cuando la asociación álamo-roya es compatible, el proceso de infección es similar independientemente de cuál sea la asociación específica. La infección se inicia cuando las urediniosporas germinan sobre la cutícula de las hojas y forman el tubo germinativo. Posteriormente, cuando el tubo germinativo se encuentra cerca de un estoma, se diferencia un apresorio y luego, el tubo germinativo ingresa a través del estoma para formar una vesícula en la cámara subestomática. Desde esta vesícula se desarrollan hifas infectivas, las cuales se van ramificando intercelularmente sobre el parénquima esponjoso para luego ponerse en contacto con las células a través de la formación de haustorios (Laurans & Pilate, 1999; Spiers & Hopcroft, 1988). Luego de un periodo aproximado de siete días se produce la agregación de

hifas debajo de la epidermis, posteriormente se rompe la epidermis y sobresalen las uredinias conteniendo las urediniosporas (signo de la roya).

#### 1.2.4- Alteraciones producidas por roya en álamos.

Los efectos de la roya sobre la productividad de las plantaciones de álamo están bien documentados. La disminución en el crecimiento en plantas enfermas se observa sobre diferentes álamos (Cortizo, 2014; May De Mio *et al.*, 2006; May De Mio & Ruaro, 2008). Si bien en la bibliografía se considera que la roya puede disminuir la densidad de la madera, a esta aseveración se llega a través de suposiciones (Steenackers *et al.*, 1996) y sólo fue apoyada por mediciones directas en un caso (Cortizo, 2014). El menor crecimiento de las plantas enfermas con roya, como comentamos anteriormente, puede ser explicado por los cambios producidos en la fisiología de las hojas afectadas. En este sentido, la información disponible es muy fragmentaria y no hay abordajes holísticos. Los abordajes más integradores comparan el perfil de expresión génica de plantas sanas y enfermas, aprovechando la característica del álamo de ser un modelo de estudio y que se dispone del genoma completo. Con esta metodología se llegó a la conclusión de que la expresión génica de procesos relacionados con la fijación de carbono son deprimidos mientras que aquellos relacionados a las rutas metabólicas de respuesta a los patógenos son activadas (Azaiez *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2007). Sin embargo, sigue siendo necesario demostrar experimentalmente los cambios ocurridos en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono como resultado de la interacción entre los álamos y la roya (Major *et al.*, 2010).

El microorganismo causante de la roya del álamo, al igual que en el resto de las royas, se convierte en un fuerte destino de nutrientes, reteniéndolos en la biomasa fúngica cuando las hojas caen anticipadamente (Cortizo, 2014). Por lo tanto, los recursos que son retenidos por el hongo no se acumularán en forma de reservas para la planta, repercutiendo negativamente en el contenido de nutrientes que la planta dispone para el crecimiento de nuevos tejidos. Además, durante el desarrollo del hongo en la hoja, éste es un destino de nutrientes, que incluso podría alterar el estado de la hoja que pasaría de ser fuente a destino de fotoasimilados. Este cambio aumentaría la retranslocación de nutrientes desde otros tejidos hacia la hoja enferma, y por lo tanto la hoja con roya podría demandar más nutrientes aún que una hoja sana. Dado que la consecuencia posterior de la enfermedad es que la hoja

infectada cae anticipadamente, en las plantas enfermas se reduciría marcadamente la disponibilidad de nutrientes para los tejidos en formación o los tejidos de reserva. Si bien existen trabajos exhaustivos donde se analiza la dinámica de nutrientes en los álamos a lo largo de las estaciones del año (Cooke & Weih, 2005; Rennenberg *et al.*, 2010), no se ha estudiado cómo esta dinámica es afectada por la roya.

#### 1.2.5- Epifitias.

Los cambios producidos por la roya a nivel de planta individual terminan repercutiendo en el estado general de las plantaciones al generarse infecciones masivas. Estas epifitias, cuando se vuelven recurrentes, obligan al remplazo del material genético utilizado hasta ese momento, ya que hacen a las plantaciones económicamente inviables. Han ocurrido epifitias de roya en diferentes lugares del mundo. Se han reportado epidemias de *Melampsora medusae* sobre híbridos de álamos (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) en Norteamérica (Newcombe & Chastagner, 1993), y de *Melampsora larici-populina* sobre *Populus nigra* en Asia y Europa (Pinon & Frey, 1997; Wan *et al.*, 2013).

En nuestro país, las epifitias sólo se han reportado para la zona del Delta del Paraná. La primera comenzó en el año 1905 y fue causada por *Melampsora medusae*, obligando al remplazo de clones de *Populus deltoides* por otros de *Populus nigra*. Una segunda epifitia se desarrolló durante los años 1935-1936, en este caso causada por *Melampsora larici-populina*, la cual obligó al cambio de *Populus nigra* por híbridos (Fernández Valiela, 1979; Golfari, 1958). A partir de ese momento la roya pasó a un segundo plano, ya que sólo se manifestaba hacia el final de la etapa de crecimiento. Sin embargo, a mediados de los 90, los ataques comenzaron a intensificarse y anticiparse en el año (Cortizo & Romero, 2000). En los valles bajo riego, si bien no se han reportado epifitias, la enfermedad está presente (Thomas & Garcés, 2011). En la región pampeana, precisamente la pampa arenosa, cuando se cultivaba *Populus deltoides* clon Catfish2 se daban eventos muy notorios de roya, mientras que en la actualidad al remplazarse ese clon por material más tolerante, la roya está presente sin llegar a causar epifitias. Sin embargo, la enfermedad es tenida en cuenta como factor en los planes de mejoramiento genético de Papel Prensa para el cultivo de álamos en esa región (comunicación personal de Ing. Ftal. Enrique Prada, Jefe de los Establecimientos María Dolores y El Gazapo, Papel Prensa

SAICFyM). En la pampa húmeda, hay referencias a la presencia de la enfermedad pero no se han observado epifitias de importancia (Ragonezze *et al.*, 1987).

Si bien el mejoramiento genético ha permitido hasta el momento controlar las epifitias, la enfermedad está presente en todas las regiones de cultivo de álamo. Es por esto que el riesgo de epifitias está latente porque pueden producirse cambios en la virulencia del microorganismo causante de la enfermedad. En este marco, es importante conocer el funcionamiento de este patosistema, los mecanismos fisiológicos de las plantas que son afectados por la enfermedad y su interacción con otros factores ambientales. Estos conocimientos brindarán herramientas para la selección de materiales genéticos más tolerantes a la enfermedad.

### **1.3- La producción de Álamos.**

La superficie mundial cubierta por álamos es del orden de los 80 millones de hectáreas, de las cuales 7 millones corresponden a plantaciones forestales (Ball *et al.*, 2005). Los principales destinos de las plantaciones son pulpa para papel, tableros contrachapados y de partículas, madera para construcción, bioenergía y usos ambientales como cortinas rompe vientos, fitorremediación, protección de suelos y cuencas hídricas (Ball *et al.*, 2005; CNA, 2012).

En Argentina, las áreas con plantaciones de álamos cubren 64.000 ha aproximadamente (Monteverde & Cortizo, 2014), y desde el punto de vista ecológico éstas pueden dividirse en tres grandes zonas: el Delta de los Ríos Paraná y Uruguay, los oasis bajo riego de las zonas áridas y la llanura bonaerense. Cada una de estas zonas tiene características diferentes que condicionan los ciclos de producción (turnos), las prácticas silvícolas, cosecha y traslado de la madera.

El Delta es una gran llanura inundable localizada en el noreste de la provincia de Buenos Aires y sur de Entre Ríos, con precipitaciones medias anuales de 1.000 mm y con crecidas cíclicas de los ríos que cubren vastas extensiones. El núcleo forestal de esta región produce álamo en terrenos protegidos por diques que evitan las inundaciones y cuentan con canales, compuertas y bombas para poder manejar los excesos de agua (Luquez *et al.*, 2012). El traslado de la madera hasta los centros de industrialización (triturado para papel o tableros, aserrado o debobinado), es predominantemente fluvial, a través de los cursos de agua, en

barcazas especialmente acondicionadas (Borodoski, 2006). En las regiones áridas de Mendoza y el Alto Valle del Río Negro (Neuquén y Río Negro), y en las provincias de La Pampa y Santiago del Estero, los álamos son cultivados en un medio con marcado déficit hídrico, suelo suelto de textura arenosa, con riego a través de un sistema de canalización. El principal destino es la producción de envases para la industria frutícola y hortícola local (Nosetti & Naves, 2013). En la región bonaerense, la producción de álamos está concentrada en la pampa arenosa, mientras que en la pampa ondulada se encuentra en estado de desarrollo inicial, con vistas a expandirse, por la cercanía a centros de procesamiento de la madera y la posibilidad de utilizar suelos marginales para la agricultura (Achinelli, 2014).

#### **1.4- Limitaciones abióticas de la producción de álamo. Estrés hídrico.**

Para expresar su potencial de crecimiento, los álamos deben crecer con una adecuada disponibilidad de agua en el suelo, por lo que es ideal que el suelo se encuentre la mayor parte del tiempo a capacidad de campo. Sin embargo, el suelo prácticamente nunca se encuentra en este punto, sino que varía su contenido de humedad constantemente. Cuanto más alejado esté el contenido de humedad de la capacidad de campo, mayores serán las consecuencias negativas sobre los álamos. A medida que el contenido de humedad del suelo supera la capacidad de campo, comienzan a llenarse de agua los poros del suelo que antes contenía aire, y el intercambio gaseoso a nivel radical disminuye. Cuando todos los poros se encuentran ocupados por agua, el intercambio gaseoso es prácticamente nulo, la difusión de oxígeno en el agua es baja, se reduce la respiración de las raíces, y las plantas padecen estrés por inundación. En el sentido contrario, cuando el contenido de humedad del suelo es menor a la capacidad de campo, para la planta es más difícil obtener el agua ya que es retenida con más fuerza por el suelo, es decir, disminuye el potencial hídrico del suelo. En el punto de marchitez permanente, las plantas no pueden absorber agua del suelo. Bajo estas circunstancias, la planta se encuentra bajo estrés por sequía, que es más marcado a medida que el contenido de agua del suelo se aleja del contenido de agua a capacidad de campo y se acerca al punto de marchitez permanente (Salisbury & Ross, 2000).

Estas situaciones de estrés hídrico, tanto por exceso como por escases, son evidentes en las zonas de producción de álamo en el país. El Delta del Paraná presenta un relieve compuesto por zonas elevadas (albardones) sobre las costas y los bordes de los meandros, y zonas bajas con aguas permanentes o semipermanentes (esteros y pajonales). Los albardones

ocupan el 20% y las zonas bajas el 80% de la superficie de las islas. Este sistema presenta un gran dinamismo, con una continua entrada y salida de agua en las zonas bajas debido a las normales crecidas del nivel de los ríos, con la ocurrencia periódica de inundaciones debido a la crecida de los ríos Paraná y Uruguay, mareas sobre el Río de La Plata y vientos fuertes. Las crecidas periódicamente son extraordinarias por la altura a la que llegan y duración, como las ocurridas a lo largo del siglo pasado (Borodoski, 2006). Bajo estas características es que existen dos sistemas de producción: por un lado, cuando sólo se realizan canales para que el agua escurra de las zonas bajas (sistema abierto), las plantaciones de álamos se dan sobre los albardones quedando esas zonas más bajas para especies más tolerantes a la inundación como el sauce. Por otro lado, cuando se produce el endicamiento y el nivel del agua es controlado totalmente mediante bombas (sistema cerrado), las zonas bajas quedan habilitadas para la producción de álamos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones (ej. nivel alto de los ríos y lluvias abundantes) el drenaje de las zonas bajas mediante las bombas es impedido por un estrato poco permeable sub-superficial, y las plantaciones quedan sometidas a periodos de inundación (Luquez *et al.*, 2012). En este mismo sistema de producción, pero bajo otras condiciones (ej. escasez de lluvias y elevada demanda evaporativa) es posible que ocurran episodios de sequía (Alvarez *et al.*, 2014).

La alternancia de periodos de sequía e inundación no son exclusivos del Delta del Paraná. En los sistemas de cultivo de álamos bajo regadío, también es posible la ocurrencia de estrés hídrico debido al mal uso del agua. En los escenarios donde predomina el riego por gravedad, puede evidenciarse un mayor aporte de agua a las plantas más próximas a las acequias con una gradual disminución en función de la distancia a la misma (Pla & Caro, 2006). Este manejo podría estar representando un estrés por sequía en el extremo distal e, incluso, periodos breves de inundación sobre la cabecera. Asimismo, en la zona de producción de la pampa ondulada y deprimida son frecuentes los periodos con baja disponibilidad de agua en el suelo durante los veranos, mientras que el anegamiento del suelo puede ocurrir en cualquier época del año, en terrenos bajos de la pampa deprimida (Achinelli, 2014; Senisterra *et al.*, 2011). Es así que en esta región, los álamos pueden estar expuestos tanto a estrés por sequía como por inundación.

#### 1.4.1- Interacción entre factores abióticos y bióticos. Roya y estrés hídrico.



Si bien los álamos poseen tasas de crecimiento elevadas en todas las regiones de Argentina descriptas, alcanzando los  $20\text{-}25\text{ m}^3\text{ ha}^{-1}\text{ año}^{-1}$ , como el crecimiento se produce durante muchos años (turnos de corta entre 10 y 15 años) las plantaciones están continuamente expuestas a estreses bióticos, abióticos y la combinación entre ambos. Esta continua exposición a factores de estrés puede hacer que el valor comercial de la forestación disminuya y que al momento de la corta final el volumen de madera logrado sea menor al volumen esperado (Casaubon *et al.*, 2002). Mientras que en condiciones de laboratorio (o invernáculo), prácticamente todos los factores de estrés pueden ser controlados, en las plantaciones tal tarea es al menos difícil, encontrándose la mayoría del tiempo bajo el efecto de varios factores de estrés simultáneamente (Niinemets, 2010). Sin embargo, no es posible determinar las consecuencias de múltiples factores de estrés que se dan en simultaneo, en función de los cambios que produce cada uno por sí solo, porque pueden existir interacciones positivas o negativas entre los factores de estrés (Bansal *et al.*, 2013).

Una forma de describir estas interacciones, es a través de los conceptos de efecto sinérgico, aditivo y antagónico (Bansal *et al.*, 2013). Cuando las consecuencias de la interacción tienen un efecto que es mayor a la suma de los efectos de cada factor por separado, hablamos de un efecto sinérgico. Cuando el efecto de la interacción es igual a la suma de los efectos por separado, el efecto es aditivo. Mientras que cuando el efecto de la interacción es menor a la sumas de los efectos por separado, el efecto de la interacción es antagónico.

Los cambios en el ambiente pueden tener un efecto directo sobre el patógeno o sobre la planta, como así también un efecto indirecto a través de interacciones en la comunidad (Desprez-Loustau *et al.*, 2006). Los cambios naturales en el ambiente, pueden crear un ambiente más favorable para la planta o para el patógeno, situación que depende de cada tipo de asociación (Boland *et al.*, 2004; La Porta *et al.*, 2008). Existen ejemplos en los que el daño por el patógeno es mayor, cuando las plantas se encuentran bajo sequía, como sucede en la asociación entre *Quercus sp.* e *Hypoxilom mediterraneum* (Vannini & Valentini, 1994) y de *Armilaria sp.* afectando raíces de *Quercus sp.* (Wargo, 1996). Otro caso en que se evidencia un efecto sinérgico es en *Persea americana*, en que el daño por *Phytophthora sp.* actuando a nivel radical es mayor cuando hay inundación (Desprez-Loustau *et al.*, 2006; Ploetz & Schaffer, 1989). También hay casos en los que el daño es mayor bajo ambas situaciones de estrés, como ocurre entre *Quercus sp.* y *Phytophthora cinnamomi* (Brasier, 1996). En otros casos el efecto combinado entre el estrés hídrico y patógenos no es del todo claro. En las royas, si bien prácticamente no hay trabajos donde se evalúe la interacción, la necesidad de humedad para la dispersión, germinación e infección por las esporas hace pensar que existirá un fuerte efecto

del estrés hídrico. Un aumento de la severidad tiene relación positiva con la mayor ocurrencia de lluvias y negativa con momentos de sequía (Desprez-Loustau *et al.*, 2006).

## 1.5- Objetivos e hipótesis.

### 1.5.1- Objetivo general.

Conocer los mecanismos fisiológicos que determinan la merma en el crecimiento de *Populus deltoides* por la infección por roya (*Melampsora medusae*).

### 1.5.2- Objetivos particulares.

Objetivo 1.1: Determinar la magnitud en la disminución del crecimiento y los posibles cambios en densidad básica de la madera debidos a la infección por roya, en condiciones de cultivo en secano, en dos clones con susceptibilidad a roya contrastante.

Hipótesis 1.1: La roya produce una disminución en el crecimiento y en la densidad de la madera, de mayor magnitud en el clon más susceptible.

Objetivo 1.2: Determinar el efecto de la interacción entre la roya y la disponibilidad de nitrógeno sobre el crecimiento en plantas en macetas expuestas a alta competencia.

Hipótesis 1.2: Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno por la fertilización, las diferencias en el crecimiento entre plantas sanas y enfermas son menores, porque mejora la capacidad de las plantas para defenderse de la roya.

Objetivo 2: Analizar los cambios en ciertos parámetros fisiológicos a nivel foliar debido a la presencia de la enfermedad (y su interacción con la disponibilidad de nitrógeno) y poder correlacionar estos cambios con el grado de infección.

Hipótesis 2: La magnitud de los cambios ocurridos en los parámetros fisiológicos a nivel foliar se relaciona con el grado de infección.

Objetivo 3: Analizar los cambios en la retranslocación de nutrientes a tejidos de almacenamiento debidos a la infección por roya.

Hipótesis 3.1: Las hojas atacadas por roya abscinden antes y con mayor contenido de nutrientes que hojas libres de roya.

Hipótesis 3.2: Las concentraciones y los contenidos de nutrientes en los tejidos de reserva son menores en las plantas que han tenido roya.

Hipótesis 3.3: Si la disponibilidad de N en el suelo es mayor, la roya tiene menor impacto negativo en la acumulación de este nutriente en los tejidos de reserva.

Objetivo 4.1: Evaluar la magnitud de la reducción en el crecimiento y acumulación de nutrientes debidos a la defoliación, de dos clones de álamo, en interacción con la disponibilidad hídrica.

Hipótesis 4.1: La disminución en el crecimiento y en la acumulación de nutrientes por efecto de la defoliación es mayor en plantas con buena disponibilidad hídrica.

Objetivo 4.2: Analizar a nivel foliar la interacción entre el estrés hídrico (por inundación y por sequía) y el grado de infección por roya.

Hipótesis 4.2: El grado de infección por roya es mayor en condiciones de buena disponibilidad hídrica. En consecuencia, el daño y la caída de hojas son más marcados en plantas a capacidad de campo.

## 1.6- Organización de la tesis.

Para poder cumplir con los objetivos planteados, esta tesis se dividió en seis capítulos y dos anexos. El primero, en el cual nos encontramos, sirve a modo de introducción y se plantean los objetivos.

En el capítulo 2, *Alteraciones en el crecimiento*, se da respuesta a los objetivos 1.1 y 1.2. Se realizó un ensayo a campo, el cual nos permitió determinar los cambios en el crecimiento (altura, diámetro del tallo principal y biomasa) debidos a la roya en plantas de 3 años bajo condiciones simuladas de producción. Otro ensayo se realizó en macetas, en el cual se evaluó el efecto en el crecimiento de la interacción entre la roya y el nitrógeno. Además, se determinó el agente causal de la enfermedad. En este capítulo están descriptos el diseño general de ambos experimentos y la metodología de los resultados presentados.

El capítulo 3, *Alteraciones en la fisiología de la hoja*, corresponde al objetivo 2. Se utilizaron los mismos ensayos a campo y en contenedores que se usaron para cumplir el objetivo 1. Se describe la metodología de los resultados presentados en este capítulo. No se repite la descripción general de los ensayos, que ya se encuentra en el capítulo 2. Se determinaron cambios en el comportamiento de variables fisiológicas a nivel foliar debidos a la roya. Las variables medidas fueron fotosíntesis, respiración, conductancia estomática, conductancia hidráulica y concentración de clorofila.

El capítulo 4, *Alteraciones en la retranslocación de nutrientes*, da respuesta al objetivo 3. Para ello se utilizó el mismo ensayo en macetas que en los capítulos anteriores. Se analizó el efecto de la roya (y la interacción con el nitrógeno) sobre la retranslocación desde las hojas senescentes como también sobre las concentraciones y contenidos totales de nitrógeno en los órganos de reserva.

El capítulo 5, *Interacción entre el estrés hídrico y la roya*, concierne a los objetivos 4.1 y 4.2. Para cumplir con este objetivo se realizaron dos nuevos ensayos en contenedores (para poder implementar los tratamientos hídricos). Estos ensayos nos permitieron determinar qué cambios produce la interacción entre la defoliación y el estrés hídrico sobre el crecimiento y la dinámica de nutrientes; y conocer la interacción entre la roya y el estrés hídrico sobre la dinámica de hojas y el rendimiento cuántico del fotosistema II.

En el capítulo 6, se realizan los contrastes de hipótesis y también se presentan las conclusiones finales y generales que se desprenden de los capítulos anteriores, dando una respuesta global al objetivo principal.

El Anexo1, *Figuras complementarias*, contiene figuras relacionadas a los capítulos 3 y 4.

El Anexo 2, *Metodologías alternativas para la cuantificación de roya*, tiene estrecha relación con el cuerpo general de la tesis y una relación puntual con el capítulo 3, ya que nos permitió relacionar los cambios fisiológicos observados con un nivel objetivo de roya.

## **Capítulo 2: Alteraciones en el crecimiento.**

## 2.1- Introducción.

Los álamos son considerados árboles de rápido crecimiento, y alcanzan tasas de crecimiento medias de 20-25 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Sin embargo, los turnos de corta (entre 10 y 15 años) hacen que las plantaciones estén continuamente expuestas a estreses bióticos y abióticos. Ambos tipos de estrés afectan al crecimiento, la calidad de la madera y pueden producir importantes pérdidas de volumen en plantaciones adultas próximas al turno de corta, con la consecuente disminución del valor comercial de los montes en pie (Casaubon *et al.*, 2002).

La roya es el principal estrés biótico. El desarrollo de la roya produce importantes pérdidas de rendimiento. Cuando plantas de *Populus sp.* son afectadas por la enfermedad puede observarse una pérdida en altura del 15% y en diámetro a la altura del pecho del 23%, que terminan significando pérdidas de volumen aéreo del orden del 50% (May De Mio & Ruaro, 2008). Estas pérdidas son mayores a medida que aumentan el nivel de severidad de la enfermedad (May De Mio *et al.*, 2006). También se observó reducción del crecimiento en las raíces en dos clones de *Populus deltoides* afectados por roya, que acumularon en el orden del 50% menos materia seca radical que las plantas sanas (Cortizo, 2014), con mayor disminución en las raíces finas (Cortizo *et al.*, 2011). Asimismo, el grado en que es afectado el rendimiento de una plantación depende fuertemente de la susceptibilidad del material genético utilizado. Las pérdidas pueden pasar de ser prácticamente insignificantes en clones muy tolerantes a rondar el 60% cuando el clon es muy susceptible (Widin & Schipper, 1981). También puede ser afectada por la enfermedad la densidad de la madera, que depende en parte de la retranslocación de esqueletos carbonados y nutrientes desde las hojas (Steenackers *et al.*, 1996). En plantas de *Populus deltoides* del clon Onda se produjo una disminución en la densidad básica de la madera cuando las plantas presentaron roya, la cual fue mínima el primer año de infección pero se volvió significativa ante la reiteración de la roya al segundo año (Cortizo, 2014).

La fertilización con nitrógeno actúa en el sentido contrario a la roya. Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno para la planta se produce un aumento del crecimiento. Plantas de *Populus deltoides* fertilizadas con N crecieron un 40% más en biomasa total, luego de una temporada de crecimiento (Coleman *et al.*, 2004). También se produjo una redistribución en la acumulación de biomasa, tendiendo a aumentar la proporción de la parte aérea sobre la



subterránea. Por lo tanto, el aumento en la disponibilidad de nitrógeno podría compensar el efecto negativo de la roya en el crecimiento. Sin embargo, la mayor disponibilidad de nutrientes en las hojas puede favorecer el crecimiento fúngico ya que el hongo contará con un sustrato más nutritivo para su crecimiento. De esta manera puede incrementarse el nivel de severidad de la enfermedad (Jensen & Munk, 1997; Robert *et al.*, 2002) y por lo tanto sus efectos negativos en el crecimiento. También se debe considerar que plantas con mayor disponibilidad de nutrientes contarán con más esqueletos carbonados para activar los mecanismos de defensa que pueden limitar el crecimiento fúngico. De esta manera, es difícil predecir si las plantas con más disponibilidad de nutrientes serán más o menos afectadas por la roya, que las plantas con menor disponibilidad de nutrientes.

## **2.2- Objetivos e hipótesis.**

Objetivo 1.1: Determinar la magnitud en la disminución del crecimiento y los posibles cambios en densidad básica de la madera debidos a la infección por roya, en condiciones de cultivo en secano, en dos clones con susceptibilidad a roya contrastante.

Hipótesis 1.1: La roya produce una disminución en el crecimiento y en la densidad de la madera, de mayor magnitud en el clon más susceptible.

Objetivo 1.2: Determinar el efecto de la interacción entre la roya y la disponibilidad de nitrógeno sobre el crecimiento en plantas en macetas expuestas a alta competencia.

Hipótesis 1.2: Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno por la fertilización, las diferencias en el crecimiento entre plantas sanas y enfermas son menores porque mejora la capacidad de las plantas para defenderse de la roya.

## 2.3- Materiales y métodos.

### 2.3.1- Determinación del agente causal de la roya, en los clones utilizados, en la ciudad de La Plata.

La clasificación de las especies de *Melampsora* sp. se basa principalmente en la morfología de las urediniosporas y teliosporas (Pei & Shang, 2005). Las urediniosporas presentan un patrón de equinulaciones interrumpidas por un área lisa. La ubicación de esta área permite discriminar a las urediniosporas de *M. larici-populina* y *M. allii-populina*, que presentan una superficie lisa en el ápice, de las urediniosporas de *M. medusae*, las cuales presentan una superficie lisa en el ecuador. Los híbridos entre *M. larici-populina* y *M. medusae* presentan una superficie lisa tanto en el ecuador como en el ápice (Spiers & Hopcroft, 1994).

Para confirmar el agente causal de la roya, se tomaron muestras de urediniosporas de ambos clones. Se montaron en agua para luego observar la morfología al microscopio y se tomaron imágenes digitales para guardar registro de las urediniosporas.

### 2.3.2- Ensayo 1.

En la primera semana de agosto de 2010 se instaló un ensayo, simulando condiciones de plantación, en la estación experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn ubicada en Los Hornos, La Plata (34° 59' 5.73" de latitud sur y 57° 59' 49.56" de longitud oeste), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (Universidad Nacional de La Plata). El suelo es un Argiudol típico (clasificación USDA), sin uso forestal previo, con vegetación herbácea espontánea. El clima es templado, con temperaturas medias anuales de 16,3 °C, precipitaciones medias anuales de 993,9 mm (Figura 1) y humedad relativa media anual del 80 % debido a su cercanía con el Río de la Plata.

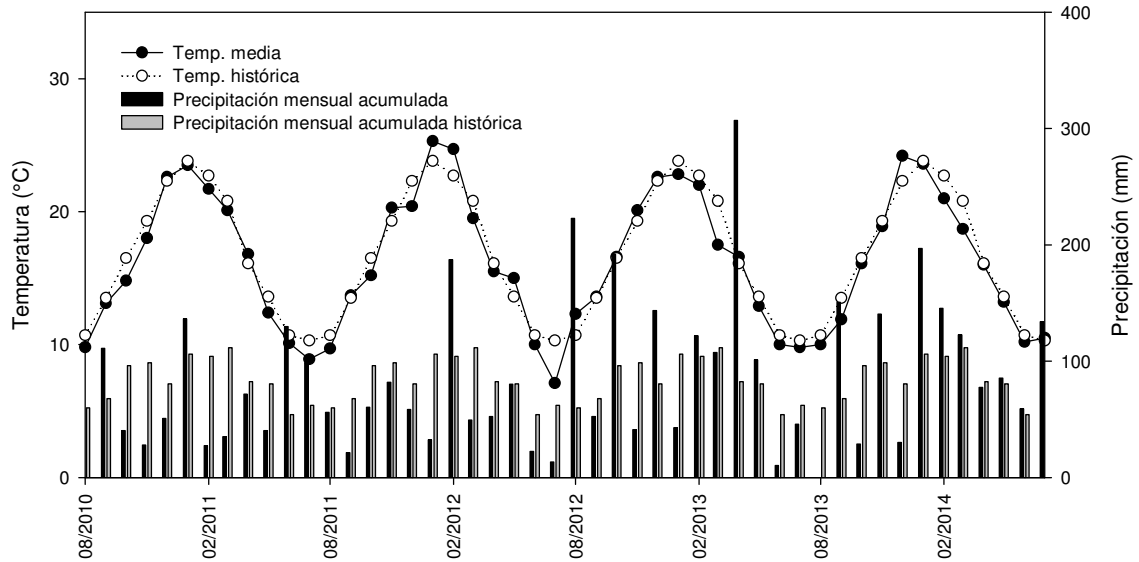
Se utilizaron estacas (1 metro de largo) de dos clones de *Populus deltoides* de diferente susceptible a la roya, el clon Onda y el clon 'Australiano 106/60'. El clon Onda es originado de Italia, sus padres son *Populus deltoides* var. *missouriensis* x *Populus* sp. (Padre no identificado).

Fue seleccionado en Casale Monferrato a partir de semillas enviadas desde el Delta del Río Mississippi, Stoneville, EEUU. Se caracteriza por ser poco ramificado, con hojas de gran tamaño y muy susceptible a roya. El clon 'Australiano 106/60', es originario de Cambera, Australia y fue seleccionado en el Department of Botany, Australian National University, de padres no identificados. Fue seleccionado a partir de semillas de *Populus deltoides* procedentes de College Station, Texas, EEUU. Es un clon más ramificado, de hojas más pequeñas, poco susceptible a roya.

Se plantaron 6 parcelas para cada clon, cada una compuesta por 36 plantas (6x6) distanciadas 3 metros entre plantas y entre filas. En 3 parcelas de cada clon, las plantas se pulverizaron con fungicida quincenalmente hasta punto de goteo, desde brotación (septiembre) hasta comienzo de la caída de hojas (mayo), considerando a estas plantas como plantas sin roya (R-). En cada fecha de pulverización se realizó una inspección visual de la totalidad de las plantas para verificar la ausencia de la enfermedad. Se utilizó un fungicida sistémico con tebuconazole como principio activo (Folicur) a una dosis de 0,258g pa/l (Cortizo *et al.*, 2011). Las otras 3 parcelas de cada clon, no recibieron tratamiento alguno y por lo tanto fueron susceptibles al ataque de roya por infección natural considerándolas como plantas con roya (R+). La presencia de la enfermedad se verificó quincenalmente mediante el registro ocular de la totalidad de las plantas de cada parcela. Se registró la fecha en que apareció la enfermedad y el nivel de incidencia (confirmación visual de la presencia o ausencia de pústulas sobre las hojas de una rama tomada al azar) para cada uno de los tratamientos, en cada una de las temporadas. Además, se estimó el número de pústulas por cm<sup>2</sup> de hoja como una medida de la severidad de la enfermedad en las primeras dos temporadas para ello se tomaron muestras de las hojas más afectadas (discos de 17,5 mm de diámetro) a las cuales se les conto el número de pústulas por unidad de área (mediante el uso de fotografías de gran resolución y del programa Image Tool). En consecuencia este ensayo tuvo 4 tratamientos: clon Onda sin roya (O R-), clon Onda con roya (O R+), clon 'Australiano 106/60' sin roya (A R-) y clon 'Australiano 106/60' con roya (A R+). Las parcelas se distribuyeron al azar dado que no se observó ningún gradiente ambiental que justificara agregar bloques. Por lo tanto el diseño experimental quedó conformado por 2 factores: clon (O y A) y roya (R- y R+).

Desde la plantación hasta agosto de 2014, fecha en que se dio por finalizado el experimento, se realizaron tareas silviculturales para evitar algunos factores de estrés, como desmalezado mecánico periódico entre filas, desmalezado químico mediante la aplicación de glifosato (3 l ha<sup>-1</sup>) alrededor de las plantas y control de hormigas mediante la aplicación de cebo granulado, también alrededor de las plantas (sulfluramida, Hortal).

La temporada 2010-2011 fue particularmente seca (Figura 1) y se observó una mortalidad del 30% de los individuos. La reposición de los individuos muertos se realizó en agosto de 2011. La disparidad en edad de los individuos se consideró aceptable ya que refleja las prácticas silviculturales habituales que incluyen la reposición de individuos muertos.



**Figura 1:** Gráfico donde se representan: temperatura media, temperatura histórica, precipitaciones acumuladas mensuales históricas y precipitaciones registradas durante el experimento (agosto de 2010 a julio de 2014).

En julio de 2014 se midió la altura y el diámetro a la altura del pecho (DAP) de todas las plantas. Posteriormente se procedió a cortar al ras del suelo un mínimo de 10 plantas por tratamiento ( $n=52$ ), uniformemente distribuidas en función de las alturas, las cuales se pesaron completamente mediante el empleo de un dinamómetro (precisión de 0,1 kg) para obtener el peso fresco aéreo total. Se eligieron plantas que cubrieran la variación existente en cada tratamiento en altura para que la función predictora a ajustar fuese aplicable a la totalidad de los valores de altura existentes. Luego se tomó una rodaja del tronco de 5 cm de ancho con corteza de la parte basal (entre los 20 y 40 cm desde el suelo) de cada una de estas plantas a la cual se le determinó el peso fresco. Se colocaron las muestras en estufa (60 °C) hasta peso constante y se calculó el contenido de humedad de la madera. Con este valor por tratamiento, se calculó el peso seco total ( $PST = \text{peso fresco aéreo total} * \text{contenido de humedad} / 100$ ) de cada planta. Se asumió un contenido de humedad constante ya que las plantas estaban en reposo otoñal.

Con los valores de altura, DAP y PST obtenidos para las plantas muestreadas, se ajustó una ecuación para poder determinar el PST del resto de las plantas del ensayo, a las que sólo se les midió altura y DAP. Se ajustó una recta para cada tratamiento y otra para el conjunto de los datos sin considerar los tratamientos. El ajuste fue mejor para el conjunto de los datos porque la magnitud del cambio en la densidad básica es despreciable en relación al efecto que tienen el DAP y la altura en el peso. Por lo tanto, se utilizó la misma ecuación para determinar PST de los dos clones en plantas sanas y enfermas. La ecuación fue la siguiente:

$$PST = 0,507 + (0,0002 * H * DAP^2) \quad (p < 0,001 \text{ y } R^2 = 0,967)$$

Por otro lado, de esas mismas muestras para PST se tomó una submuestra para determinar la densidad básica de la madera (n=52), tomando como referencia la norma TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) T 258 om-94 (Arango *et al.*, 2001; Monteoliva & Senisterra, 2008). Las muestras fueron descortezadas, colocadas en agua durante 48 hs hasta que se encontraron saturadas de agua y luego se determinó el volumen saturado mediante el pesaje del volumen de agua desplazado. Posteriormente se pusieron en estufa (60 °C) hasta peso constante y se obtuvo el peso anhidro. La densidad básica de la madera se calculó como el cociente entre el peso anhidro y el volumen saturado. Para confirmar la independencia entre la densidad básica de la madera y el diámetro, se ajustó una regresión lineal simple entre ambos parámetros.

### 2.3.3- Ensayo 2.

En la primer semana de agosto de 2012, se instaló un ensayo en macetas de 40 litros rellenas con una mezcla de arena y tierra (relación 10/1) en las dependencias del INFIVE (34°54'45.64" de latitud sur y 57°55'51.01" de longitud oeste), lugar que presenta condiciones ambientales similares a las del ensayo 1. Se utilizaron estacas de 40cm de longitud de los clones Onda y 'Australiano 106/60', clones que fueron usados en el ensayo 1. Las macetas se ubicaron en un predio abierto, alejado de edificios y se regaron periódicamente para mantener el suelo a capacidad de campo en función de las precipitaciones que ocurrieron durante el ensayo.

En este ensayo se compararon plantas con y sin roya de ambos clones siguiendo la misma metodología que en el ensayo 1, pero además se compararon dos disponibilidades de nitrógeno. Para lograr esto, la mitad de las plantas recibió dos adiciones de nitrógeno (N, 5g de

urea) en los días 26 de octubre y 21 de diciembre de ese año. La dosis utilizada se estimó en función de las dosis utilizadas en plantaciones (Achinelli *et al.*, 2003) y el hecho de realizar la aplicación en dos momentos diferidos en el tiempo fue para evitar posible toxicidad del fertilizante.

Se utilizaron 5 plantas por tratamiento distribuidas de forma aleatoria. Los tratamientos fueron los siguientes: clon Onda sin roya sin N (O R-N-), clon Onda sin roya con N (O R-N+), clon onda con roya sin N (O R+N-), clon Onda con roya con N (O R+N+), clon 'Australiano 106/60' sin roya sin N (A R-N-), clon 'Australiano 106/60' sin roya con N (A R-N+), clon 'Australiano 106/60' con roya sin N (A R+N-) y clon 'Australiano 106/60' con roya con N (A R+N+). Por lo tanto el diseño experimental quedó conformado por 3 factores: clon (O y A), roya (R- y R+) y nitrógeno (N- y N+).

Luego de la caída otoñal de las hojas, en julio de 2013, se midió altura y diámetro del tallo a la altura del cuello (DAC) de todas las plantas. Se cortó el tallo desde el DAC, se lavaron las raíces y se colocó todo el material en estufa a 60 °C hasta peso constante. Posteriormente se discriminó entre tallo, estaca, raíces finas (menores a 5mm) y raíces gruesas (mayores a 5mm), y se pesaron para obtener la biomasa total y por compartimento.

#### 2.3.4- Análisis estadístico y presentación.

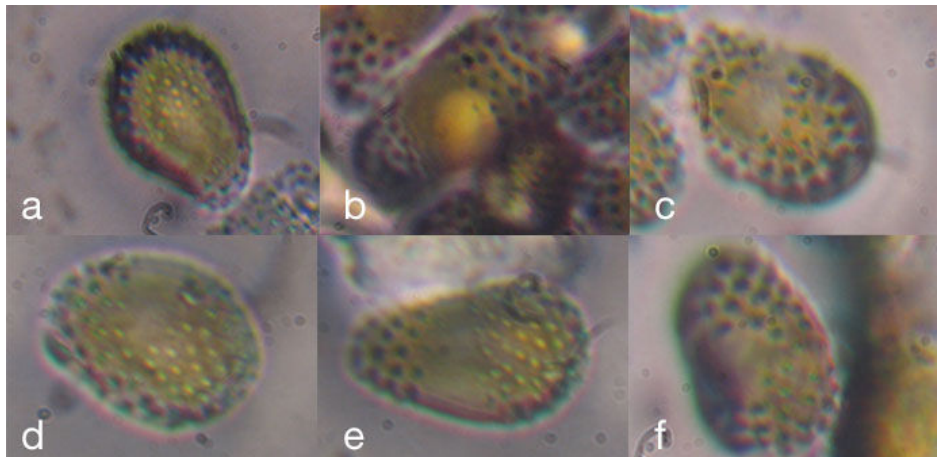
Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Duncan, ambos con una significancia del 95%. En el ensayo 1 los factores considerados fueron Clon (C) y Roya (R). En el ensayo 2 además se incorporó el factor nitrógeno (N).

Para la realización de las figuras se tomaron las medias y los errores estándar provenientes de los ANOVA realizados. Además, los valores de p derivados del ANOVA se muestran en la figura resaltándose en negrita el factor o los factores estadísticamente significativos (dentro del gráfico sobre la parte superior). Cuando fue necesario, se agregó a la figura (a la derecha del gráfico) el/los test de Duncan de los factores o interacciones con diferencia significativa.

## 2.4- Resultados.

### 2.4.1- Determinación del agente causal.

Las urediniosporas encontradas eran de forma ovoide u oblonga, y presentaban en la zona central una superficie lisa (Figura 1). La presencia de la zona lisa en la parte central nos indica que la especie es *Melampsora medusae*. La misma especie fue citada para los clones de *Populus deltoides* utilizados en esta tesis en la zona del Delta del Paraná (Cortizo, 2014; Cortizo & Romero, 2000).



**Figura 1:** Imágenes al microscopio óptico (100x) de las urediniosporas de *Melampsora medusae* presentes en las hojas del clon Onda (a, b y c) y en el clon 'Australiano 106/60' (d, e y f).

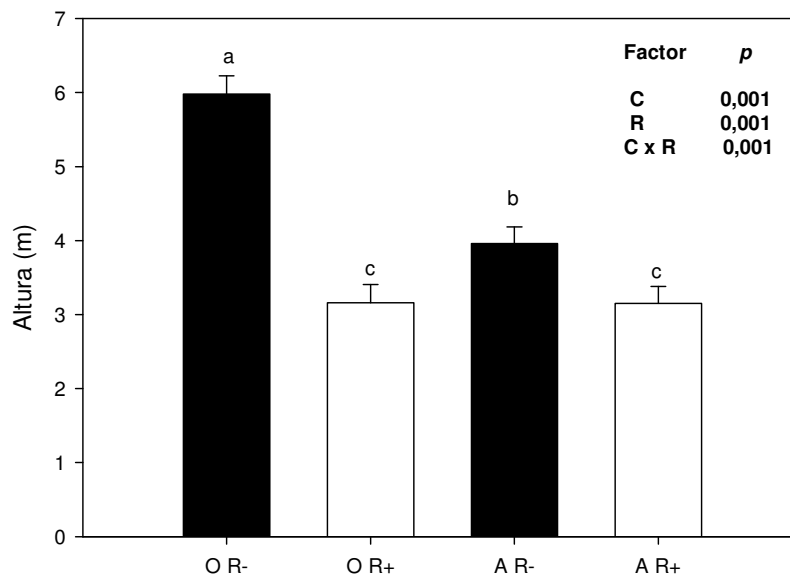
### 2.4.2- Ensayo 1.

La aparición de los primeros síntomas de la enfermedad ocurrió los primeros días de febrero en la temporada 2010-2011, a mediados de marzo en la temporada 2011-2012, principios de enero en la temporada 2012-2013 y mediados de febrero en la temporada 2013-2014. Las plantas de las parcelas pulverizadas no presentaron roya en ninguno de los años (incidencia 0 %). Todas las plantas de las parcelas no pulverizadas presentaron roya todos los años (incidencia 100 % para ambos clones). El número de pústulas máximo registrado por  $\text{cm}^{-2}$  fue de 51,2 para el clon Onda y de 6,7 para el clon 'Australiano 106/60' en la temporada 2010-



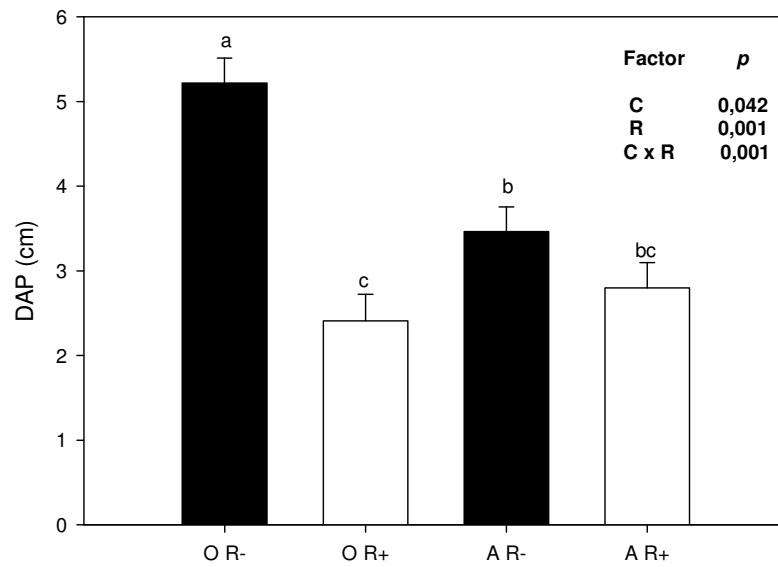
11 mientras que en la temporada 2011-2012 fue de 44,8 y 15,3 pústulas por  $\text{cm}^{-2}$  para el clon Onda y 'Australiano 106/60', respectivamente.

Al finalizar el ensayo, la altura fue menor en las plantas enfermas que en las plantas sanas. En el clon Onda la reducción en altura fue del 50 %, mientras que en el clon 'Australiano 106/60' la reducción fue del 20 % (Figura 2). En DAP la tendencia fue la misma. Sin embargo, si bien hay una reducción significativa del 55 % para el clon Onda, para el clon 'Australiano 106/60' la reducción fue del 20 % para las plantas enfermas, no llegando a ser significativa (Figura 3).

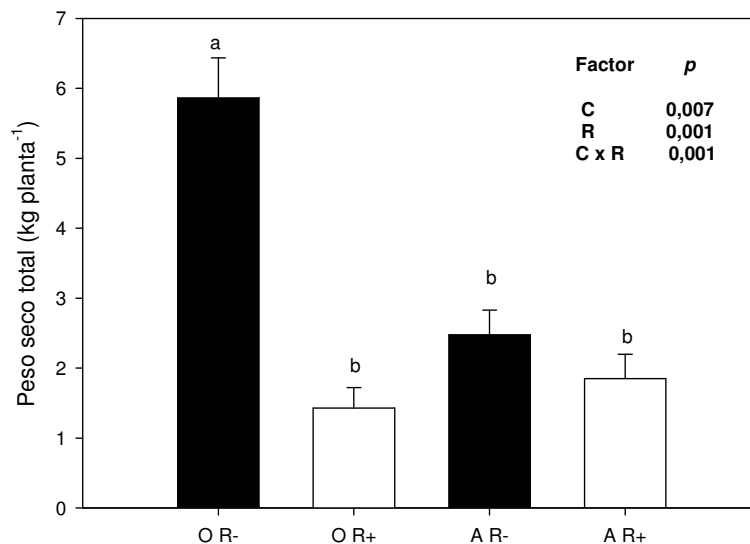


**Figura 2:** Altura promedio de las plantas para los diferentes tratamientos luego de 4 temporadas de crecimiento a campo con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

El peso seco total por planta del clon 'Australiano 106/60' fue similar entre plantas sanas y enfermas. En cambio, en el clon Onda hubo una disminución del 75 % en el peso de las plantas enfermas con respecto a las sanas (Figura 4).

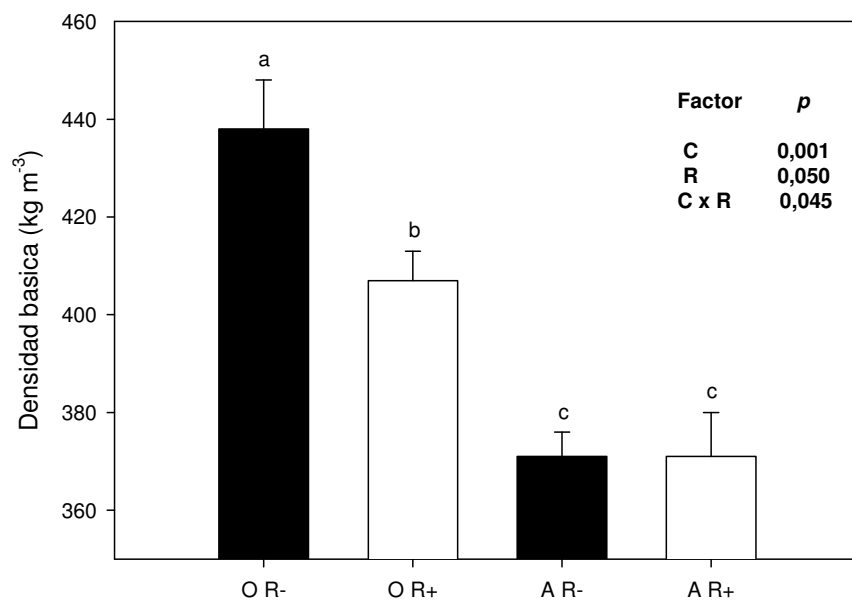


**Figura 3:** Diámetro del tallo a 1,3 m de altura (DAP) (cm) promedio de las plantas para los diferentes tratamientos, luego de 4 temporadas de crecimiento a campo con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

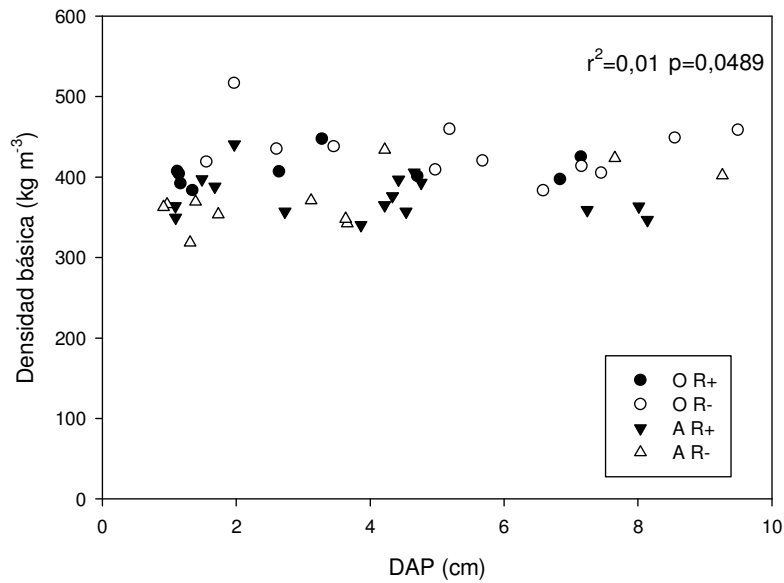


**Figura 4:** Peso seco total (kg planta<sup>-1</sup>) promedio de las plantas para los diferentes tratamientos luego de 4 temporadas de crecimiento a campo, con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

La densidad básica de la madera (DB) fue diferente entre clones. En el clon Onda la DB fue del orden de los 400 kg m<sup>-3</sup> mientras que en el clon 'Australiano 106/60' fue menor (370 kg m<sup>-3</sup>), con una disminución debido a la roya sólo para el clon Onda (Figura 5). Las diferencias en la DB no se debieron a las diferencias en DAP ya que cambios en el DAP no implican cambios en la DB (Figura 6).



**Figura 5:** Densidad básica (kg m<sup>-3</sup>) de la madera promedio de las plantas, para los diferentes tratamientos luego de 4 temporadas de crecimiento a campo, con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan, p<0,05).



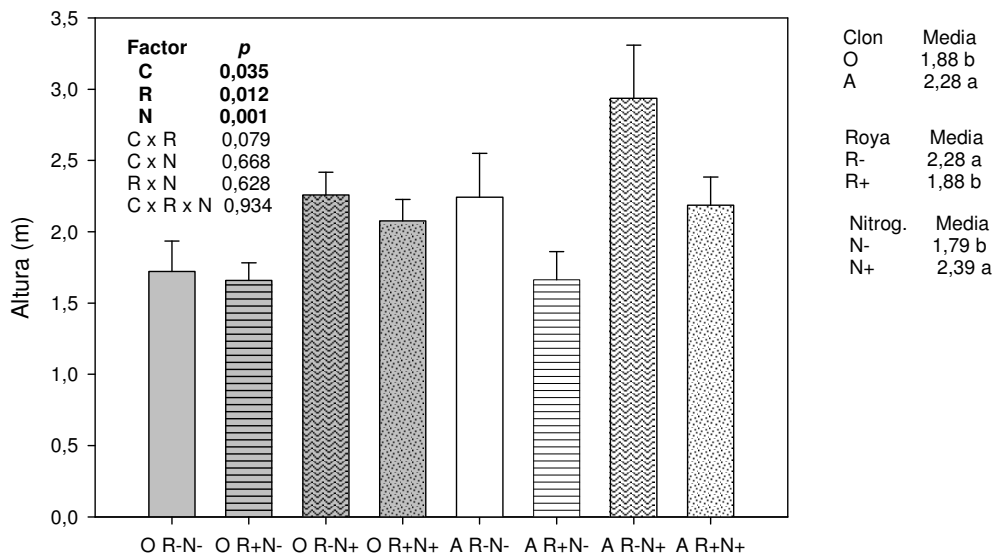
**Figura 6:** Densidad básica de la madera (kg m<sup>-3</sup>) en función del DAP (cm) para los diferentes tratamientos. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de  $r^2$  y  $p$  de la regresión.

#### 2.4.3- Ensayo 2.

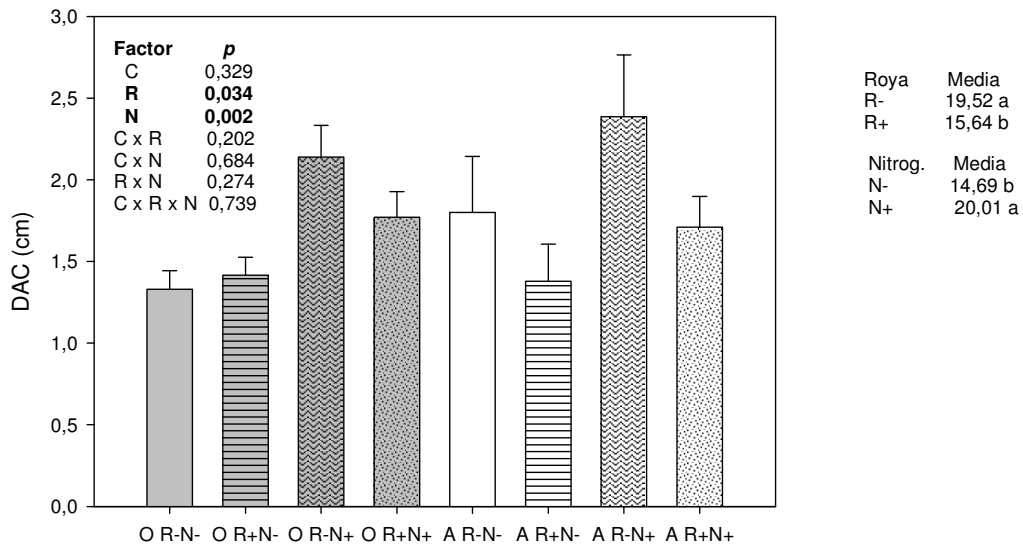
La aparición de los primeros síntomas de la enfermedad ocurrió los primeros días de enero de 2013. Las plantas pulverizadas de ambos clones no presentaron roya (incidencia 0%). Todas las plantas no pulverizadas en ambos clones presentaron roya (incidencia 100 %). El nivel de severidad fue del 70 % en plantas del clon Onda mientras que fue del 30 % en plantas del clon 'Australiano 106/60'. No hubo diferencias en la severidad de roya entre las plantas con baja y alta disponibilidad de N.

La altura de las plantas fue modificada por la disponibilidad de nitrógeno, por la roya y también por el clon; sin embargo no hubo interacción entre los factores. Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno hubo un incremento en la altura de aproximadamente el 30 % para ambos clones, tanto en las plantas sanas como las enfermas. La altura fue menor en las plantas enfermas que en las plantas sanas. En el clon Onda, la reducción en altura fue del 5 % y en el clon 'Australiano 106/60' la reducción fue del 25 %, independientemente de la disponibilidad de nitrógeno (Figura 7).

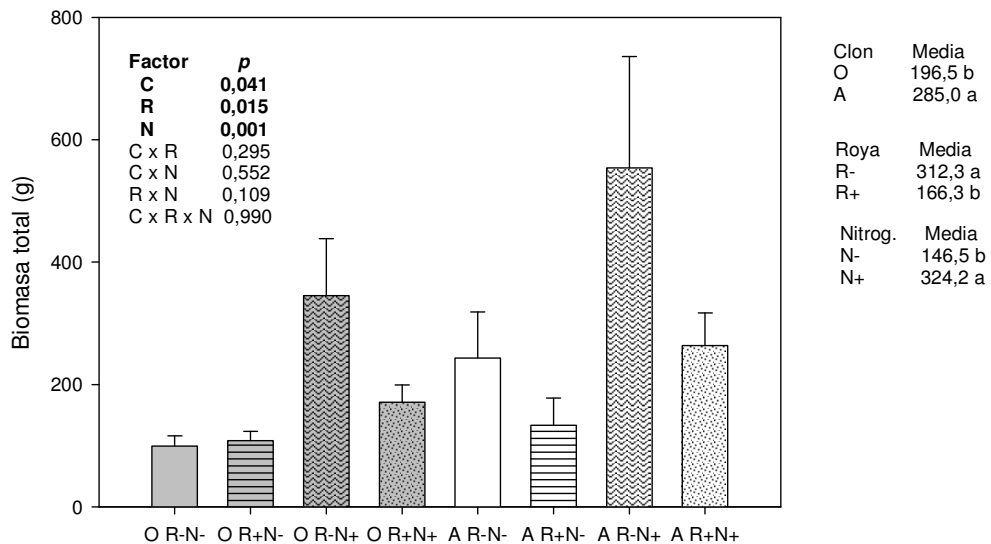
El DAC fue modificado por la disponibilidad de nitrógeno y la infección por roya, sin interacción entre los factores. Hubo un aumento del DAC cuando las plantas fueron fertilizadas, el cual rondó el 30 % (y puntualmente del 60 % al comparar los tratamientos O R- N- y O R- N+). La roya produjo una reducción en el DAC del orden del 25 % en el clon 'Australiano 106/60' al comparar plantas con roya y planas sin roya. En el caso del clon Onda, la reducción en DAC fue del 20 % al comparar plantas sanas y enfermas con alta disponibilidad de nitrógeno. No hubo reducción cuando las plantas se encontraban con baja disponibilidad de nitrógeno (Figura 8).



**Figura 7:** Altura promedio de las plantas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen derecho se presentan los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.



**Figura 8:** Diámetro a la altura del cuello promedio de las plantas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen derecho se presentan los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.

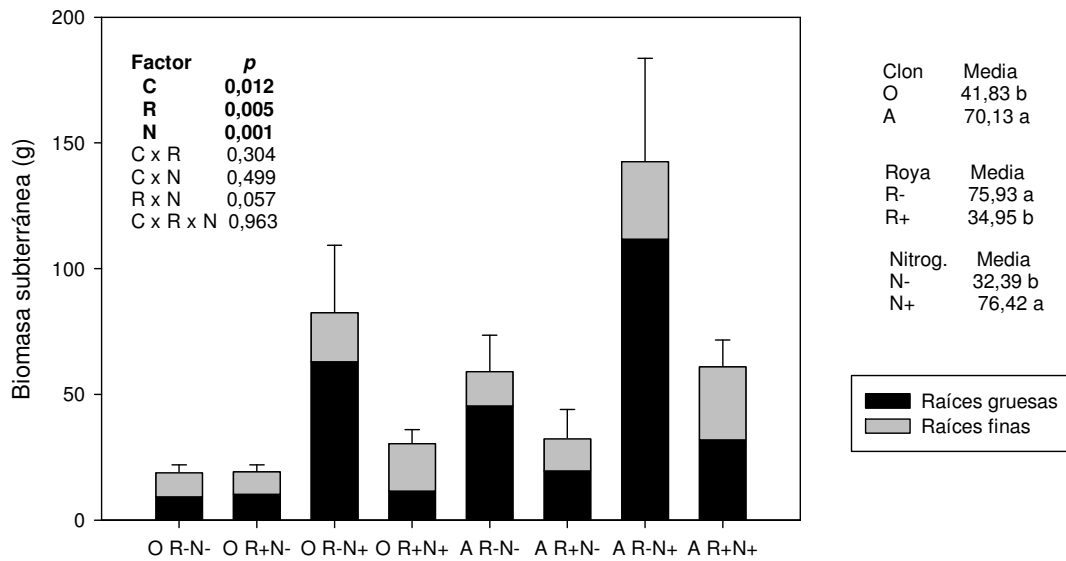


**Figura 9:** Biomasa total (g) de las plantas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA de la biomasa subterránea total, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen derecho se presentan los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.

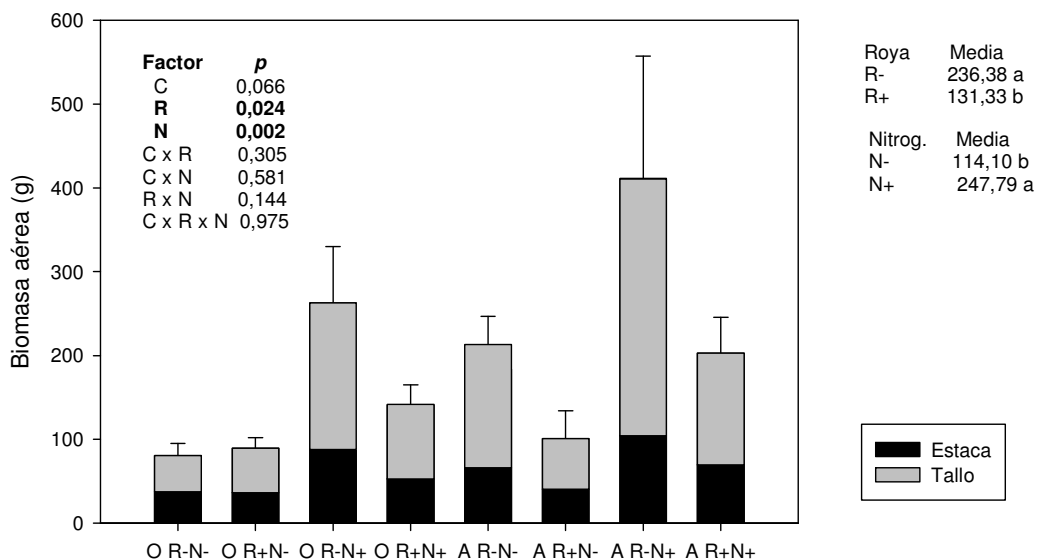
La biomasa total varió según la disponibilidad de nitrógeno ( $p=0,001$ ), la infección con roya ( $p=0,015$ ) y según el clon ( $p=0,041$ ); sin interacción entre los factores. Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno se produjo un aumento en la producción de biomasa total de aproximadamente el 100 % en el clon 'Australiano 106/60', tanto en plantas sanas como enfermas. En el caso del clon Onda aumentó la acumulación de biomasa total aproximadamente el 250 % al comparar las plantas sin roya con baja y alta disponibilidad de nitrógeno mientras que en las plantas enfermas el aumento debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno fue del 60 %. La presencia de la roya produjo una disminución en la acumulación de biomasa total. Esta disminución fue del 50 % en el clon 'Australiano 106/60', comparando las plantas sanas con las enfermas. Sin embargo, si bien en el clon Onda con alta disponibilidad de nitrógeno la disminución en la acumulación de biomasa fue del mismo orden (aproximadamente 50 %), cuando las plantas se encontraron con baja disponibilidad de nitrógeno la acumulación de biomasa total fue similar en plantas sanas y enfermas (Figura 9).

La tendencia observada en la acumulación de biomasa total se mantuvo cuando la biomasa fue analizada por compartimentos. Hubo una disminución en la acumulación de biomasa subterránea debido a la escasez de nitrógeno y a la roya. Asimismo queda evidenciada una mayor producción de raíces en el clon 'Australiano 106/60' al compararlo con el clon Onda (Figura 10).

También se mantuvo esta misma tendencia en la acumulación de biomasa aérea. La mayor disponibilidad de nitrógeno se reflejó en un aumento de la biomasa aérea, tanto de tallos como de la estaca, mientras que la presencia de roya redujo la biomasa aérea (Figura 11).



**Figura 10:** Biomasa subterránea (g) de las plantas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA de la biomasa subterránea total, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen derecho se presentan los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.



**Figura 11:** Biomasa aérea (g) de las plantas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen derecho se presentan los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.



## 2.5- Discusión.

Los dos clones de álamo utilizados son ampliamente cultivados en el Delta del Paraná, en la zona núcleo de producción forestal. El clon Onda ha sido evaluado experimentalmente bajo regadío en Río Negro, en donde alcanzó un DAP de 6 cm a los 2 años (Thomas & Garcés, 2011) y un DAP de 10,8 cm a los 4 años (Thomas & Cortizo, 2014); valores similares fueron registrados en el clon 'Australiano 106/60' a la misma edad en el Delta del Paraná (Cortizo & Monteverde, 2011). Ambos registros son muy superiores al crecimiento alcanzado en el ensayo 1. La diferencia posiblemente se debe a que en nuestro experimento el cultivo se realizó en seco, y particularmente los veranos 2010-11 y 2011-12 fueron excepcionalmente secos produciendo eventos de estrés hídrico (Figura 1). De esta manera, los resultados obtenidos en este ensayo deben ser interpretados como el resultado de la interacción de la roya con otros estreses abióticos, a los que están sometidas las plantas que crecen a campo. Si bien los ensayos a campo no permiten aislar el efecto de la enfermedad del resto de los factores, tienen la ventaja de que el crecimiento no es limitado artificialmente y que representan las condiciones típicas de la producción forestal.

El crecimiento en altura disminuyó en ambos clones como consecuencia de la enfermedad (Figura 2). Sin embargo, en el clon 'Australiano 106/60' la roya no redujo marcadamente ni el crecimiento en el DAP (Figura 3), ni el peso seco total (Figura 4), tal como lo hizo en el clon Onda. La fuerte reducción en el peso total de la planta en el clon Onda enfermo, se debió a la gran reducción de altura y diámetro del tallo, junto con una marcada reducción de la densidad básica de la madera (Figura 5). Contrariamente, en el clon 'Australiano 106/60' la enfermedad redujo la altura en menor medida, tendió a reducir el DAP y no modificó la densidad de la madera, por lo que la materia seca aérea total de la planta no se redujo significativamente con la enfermedad.

En cada clon, las diferencias encontradas entre plantas sanas y enfermas se deben a la susceptibilidad diferencial. Estas diferencias en la susceptibilidad pueden deberse a varios motivos: a la arquitectura de la planta, a grosor de la cutícula, a diferencias en la rugosidad en la superficie foliar, o a la orientación y tamaño de la hoja que alteren la probabilidad de que la espora del hongo sea interceptada, y la arquitectura de la copa, que puede determinar que se den las condiciones de temperatura y humedad sobre la hoja posibilitando la germinación de la espora (Siwecki & Przyby, 1981). También es posible que el clon 'Australiano 106/60' genere

algún tipo de reacción de defensa temprana y más fuerte frente al ataque de roya, que reduzca la virulencia del parásito; entre éstas se pueden encontrar la síntesis de metabolitos secundarios, hormonas, fitoalexinas, especies reactivos del oxígeno y proteínas relacionadas con la patogénesis (Miranda *et al.*, 2007; Vrancken *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). En función de estas características, los procesos de asimilación de carbono serán afectados en diferente magnitud (capítulo 3) como así también la dinámica foliar y la retranslocación de nutrientes a los tejidos de reserva (capítulo 4).

La densidad básica de la madera registrada (Figura 5) en ambos clones está en el rango de lo reportado para otros clones de *Populus* en Estados Unidos, la cual varío entre 290 y 460 kg m<sup>-3</sup> (DeBell *et al.*, 2002). En éstos y otros clones de *Populus deltoides*, la densidad de la madera no se relacionó consistentemente con la tasa de crecimiento (Klašnja *et al.*, 2008). En este sentido, las plantas sanas del clon Onda, que crecieron más que el clon 'Australiano 106/60', son las que tuvieron mayor densidad de la madera, reafirmando que no hay una relación negativa entre tasa de crecimiento y densidad de la madera. El clon 'Australiano 106/60' tuvo una densidad de la madera similar en plantas sanas y enfermas (Figura 5). Posiblemente, dado el bajo nivel de severidad de la enfermedad en este clon, la reducción en la retranslocación de nutrientes y fotoasimilados al tallo no fue afectada significativamente por la roya, que tampoco redujo el diámetro del fuste (Figura 4).

Las variaciones observadas en el ensayo 1 entre plantas sanas y enfermas del clon Onda se debieron quizás a que la enfermedad redujo la capacidad de fijar carbono, como también redujo la retranslocación de fotoasimilados y nutrientes hacia el tallo. Es así que, posiblemente, las plantas enfermas posean paredes celulares más delgadas, que redunden en menor densidad de la madera. De esta manera, el sistema de sostén y conducción necesario para el crecimiento se construye con menor cantidad de materia seca (Larjavaara & Muller-Landau, 2010). Sin embargo en *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, la enfermedad foliar causada por *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rohde) Petrak aumentó la densidad de la madera porque aumentó la proporción de leño tardío con respecto al temprano (Johnson *et al.*, 2005). En el caso del álamo, no existe diferenciación tan marcada entre las propiedades de los leños (tamaño del lumen y engrosamiento de la pared secundaria de las fibras), y posiblemente por eso la enfermedad reduce la densidad de la madera. Consistentemente, en el clon Onda, se observó reducción en la densidad de la madera en guías de 1 año producidas a partir de cepas que estuvieron enfermas previamente durante dos veranos en el Delta del Paraná, en comparación con guías derivadas de cepas sanas (312 vs 323 kg m<sup>-3</sup> guías de cepas enfermas y sanas, respectivamente) (Cortizo, 2014). Los valores de DB determinados en nuestro

experimento son mayores que los reportados en Cortizo (2014), posiblemente porque la densidad de la madera puede incrementarse con la edad de los árboles (DeBell *et al.*, 2002). Asimismo, en ambientes más secos la densidad de madera es mayor que en climas más húmedos (Goyal *et al.*, 1999); como los estaqueros utilizados por Cortizo (2014) están instalados en el Delta del Río Paraná, donde la disponibilidad de agua es mayor que en la estación experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn, la disponibilidad de agua que tuvieron las plantas también puede explicar la mayor DB registrada en nuestro experimento. En cuatro ambientes diferentes en Canadá, la DB de un clon de *P. deltoides*, a los 3 años de edad, varió entre 470 y 380 kg m<sup>-3</sup>; sin embargo, las diferencias se fueron reduciendo con la edad de los árboles, y a los 10 años en todos los sitios la DB fue de 380 kg m<sup>-3</sup> (Pliura *et al.*, 2006). Otra causa de la marcada diferencia en la DB entre guías que se producen en estaqueros, con plantas creciendo con poco espaciamiento, y plantaciones más espaciadas, es la diferente competencia entre individuos. En un estaquero, el cierre de canopeo se produce tempranamente, y el sombreado estimula el alargamiento de los entrenudos y por lo tanto, el crecimiento en altura. Al contrario, en nuestro experimento, las plantas estaban distanciadas, sin competencia entre individuos, con radiación directa en la totalidad de la copa. Con irradiancias moderadas a altas se reduce el alargamiento de los tallos. A su vez, la mayor exposición al viento en plantaciones más espaciadas incrementa el estrés mecánico, que propicia el aumento de la densidad de la madera, lo que contribuye a reducir el riesgo de quiebre y mantener la posición vertical del árbol (Fournier *et al.*, 2013).

Cuando analizamos los resultados del ensayo 2, observamos que la altura y el DAC aumentan en un 30 %, en las plantas con mayor disponibilidad de nitrógeno, independientemente del clon. Consecuentemente, con la fertilización nitrogenada la biomasa aumenta en plantas sanas en un 100 % en el clon 'Australiano 106/60' y en un 250 % en el clon Onda. Aumentos del orden del 40 % fueron reportados para *Populus deltoides* en los Estados Unidos (Coleman *et al.*, 2004), por lo que estos resultados son semejantes a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, en plantas enfermas del clon Onda el aumento debido a la fertilización es sólo del 60 % (Figuras 7 y 8). En este mismo ensayo, cuando las plantas presentaron roya se produjo una reducción en el crecimiento, en concordancia con los resultados del ensayo 1. Sin embargo, la reducción en altura (Figura 7) y DAC (Figura 8) fue mucho más marcada en el clon 'Australiano 106/60' que el clon Onda, a la inversa de lo observado en el ensayo a campo. Una posible explicación a esta situación podría ser la forma en que se realizó el ensayo. En el ensayo en macetas las plantas de ambos clones se encontraban mezcladas y a una distancia de aproximadamente 50 cm entre plantas, y por lo

tanto expuestas a una fuerte competencia por luz. La arquitectura de la copa del clon 'Australiano 106/60' seguramente lo favoreció en comparación con el clon Onda, el cual puede desarrollar su potencial en condiciones de más disponibilidad de luz como en el ensayo a campo (ensayo 1). Además, la alta densidad de plantas del ensayo pudo haber dificultado el movimiento del aire creando un ambiente relativamente más húmedo, el cual pudo favorecer el desarrollo de la enfermedad, como sugieren los altos niveles de severidad encontrados (70 % para el clon Onda y 30 % para el con 'Australiano 106/60'). La diferencia en el efecto de la roya sobre el clon 'Australiano 106/60' en los ensayos a campo y en contenedores puede deberse a que, en condiciones de baja o moderada severidad de la enfermedad (ensayo 1), el clon 'Australiano 106/60' se comporta con mayor tolerancia, sin diferencias claras en el crecimiento entre plantas sanas y enfermas, posiblemente debido a la producción de compuestos secundarios. Sin embargo, cuando los niveles de infección son altos, como el caso del ensayo 2, el costo de esas defensas podría repercutir negativamente en el crecimiento.

La reducción en la acumulación de biomasa total por efecto de la roya fue del 50 % cuando comparamos las plantas sanas y las enfermas, exceptuando las plantas sanas y enfermas del clon Onda con baja disponibilidad de nitrógeno, donde no hubo diferencias en la acumulación de biomasa (Figura 9). Este patrón se repite en la acumulación de biomasa aérea (Figura 11). La reducción en la acumulación de biomasa subterránea toma valores del 50 % en el caso del clon 'Australiano 106/60' mientras que para las plantas del clon Onda con alta disponibilidad de nitrógeno la reducción llegó al 65 % cuando tienen roya (Figura 10). Si bien estadísticamente no hubo interacción entre la roya y disponibilidad de nitrógeno, de los resultados anteriores se pueden extraer algunas observaciones. Puntualmente para el clon Onda, cuando la disponibilidad de nitrógeno es baja no hay efecto de la roya y tanto las plantas sanas como enfermas tienen valores de biomasa total similares. Ahora, cuando analizamos para cada clon, las pérdidas en la acumulación de biomasa total, aérea y subterránea, son mayores cuando las plantas se encuentran con alta disponibilidad de nitrógeno. Esta respuesta posiblemente se deba a que sobre las hojas con más nitrógeno se acorta el ciclo reproductivo de la roya (Jensen & Munk, 1997; Robert *et al.*, 2002). Posiblemente las esporas del hongo germinen y crezcan más rápido en las hojas con más nutrientes. Es así que probablemente se produzcan más ciclos de infección y mayor crecimiento fúngico dentro de cada hoja de plantas fertilizadas. Este crecimiento fúngico demandará más nutrientes y esqueletos carbonados y tornará a las hojas enfermas destino de más nutrientes, provenientes de otros órganos. Posteriormente, una gran proporción de estos nutrientes caerán con las hojas, ya que la enfermedad acelera la abscisión foliar. Por lo tanto,

la enfermedad afectará en mayor proporción el crecimiento de las plantas con más disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

## 2.6- Conclusiones.

En condiciones de campo en seco, sin competencia entre las plantas, la roya produce una fuerte reducción del crecimiento en altura y DAP en el clon Onda mientras que en el clon 'Australiano 106/60' estos efectos son menores.

Bajo esas mismas condiciones, en el clon Onda hay una disminución en la densidad básica de la madera debido a la roya, no así para el clon 'Australiano 106/60'.

Como consecuencia de las pérdidas en crecimiento en altura, DAP y DB el peso seco total por planta se reduce notoriamente en el clon Onda cuando las plantas están enfermas. No ocurre lo mismo en el clon 'Australiano 106/60'.

En plantas más pequeñas, en maceta con riego frecuente, bajo fuerte competencia entre plantas por luz, la disminución en altura y DAC en las plantas con roya es más notoria en el clon 'Australiano 106/60'.

Bajo esas mismas condiciones, la pérdida en la acumulación de biomasa es similar en ambos clones, aunque para el clon Onda se ve más resentida la biomasa subterránea.

La disponibilidad de nitrógeno no interacciona con la presencia de la roya.

El efecto de la roya sobre los distintos clones depende de la interacción con otros factores de crecimiento (luz, agua y nutrientes).

## **Capítulo 3: Alteraciones en la fisiología de la hoja.**

### 3.1-Introducción.

En el capítulo 2 demostramos que la presencia de la roya produce una disminución en el crecimiento. La causa de esta disminución se debe a que la roya, al igual que otros patógenos, altera varios procesos fisiológicos a nivel foliar. Trabajos transcriptómicos revelan que, en las interacciones compatibles entre *Melampsora sp.-Populus sp.*, genes asociados con la fotosíntesis son regulados negativamente mientras que genes asociados a la respiración y procesos de defensa son regulados positivamente (Azaiez *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2007). La disminución de la fotosíntesis en los tejidos infectados se observa junto con una disminución de otros procesos de asimilación, y se observa conjuntamente un aumento en la respiración y otras rutas metabólicas para generar los recursos requeridos para la reacción de defensa (Major *et al.*, 2010). Además, las hifas que invaden el mesófilo son capaces de alterar el metabolismo de la hoja para favorecer la movilización de metabolitos hacia las células fúngicas (Berger *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2007).

A pesar de que la interacción *Populus sp-Melampsora sp* se ha convertido en un modelo para estudios genéticos y moleculares, existen pocos acercamientos fisiológicos que describan la respuesta del hospedante al patógeno. En este sentido, se observó en hojas de *Populus cathayana* infectadas con roya que la fotosíntesis y la conductancia estomática disminuyen a la mitad con respecto a hojas sanas, aunque no se reduce la concentración de clorofila (Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, estos cambios fisiológicos están bien documentados en otros patosistemas, en los cuales se observaron disminuciones de la fotosíntesis de diferentes magnitudes, como por ejemplo del 50% en hojas de *Salix sp.* infectadas con roya (Toome *et al.*, 2009) y de hasta 80% en hojas de *Phaseolus vulgaris* afectadas por *Uromyces appendiculatus* (Bassanezi *et al.*, 2001). En estos casos, la reducción en la fotosíntesis está asociada con una disminución en el contenido de clorofilas y en la conductancia estomática. La disminución en la fotosíntesis neta puede también deberse a un aumento en la respiración. Por ejemplo, la disminución en la fotosíntesis que se observa en hojas de *Triticum aestivum* infectadas con *Puccinia tritica* es acompañada con un aumento en la respiración del 50% (Carretero *et al.*, 2011). Este aumento en la respiración (emisión de CO<sub>2</sub>) detectado en las hojas infectadas puede deberse tanto al aumento en la respiración del hospedante como a la respiración propia del hongo.



Sin embargo, en otro trabajo, se observó que *Melampsora larici-populina* reduce la fotosíntesis neta de *Populus cathayana* más del 50%, aunque el nivel de daño en el fotosistema II es muy leve ( $F_v/F_m = 0,84$  en plantas sanas y  $0,78$  en plantas enfermas) (Zhang *et al.*, 2009). También el intercambio gaseoso puede reducirse, debido a que las hifas ocuparían la cavidad subestomática y los espacios intercelulares (Spiers & Hopcroft, 1988) y producirían la pérdida de estructura del mesófilo. Este tipo de daño reduciría el intercambio gaseoso a través de los estomas y puede aumentar la resistencia hidráulica en el interior de la hoja, afectando la fotosíntesis y el estado de hidratación foliar independientemente de la integridad del sistema fotosintético.

Es importante destacar que la capacidad fotosintética de una planta no es la misma en todos los ambientes, sino que depende en gran medida de los recursos disponibles, como temperatura, nutrientes y agua. Si la temperatura y el agua no son limitantes, los nutrientes pueden afectar la fotosíntesis y el nivel de daño que produzca la enfermedad. La fotosíntesis depende en gran medida del estado nutricional de las hojas, particularmente del contenido de nitrógeno. Existe una relación muy fuerte entre el aumento en el contenido de nitrógeno en las hojas de plantas C3 y el aumento en la tasa fotosintética, la cual es ampliamente aceptada (Evans, 1989). La fotosíntesis aumenta un 100% cuando plantas de *Populus deltoides* son fertilizadas con nitrógeno ya sea en forma de nitrato o amonio (Li *et al.*, 2014). Si bien la mayor disponibilidad de nitrógeno tiene un efecto positivo sobre la capacidad fotosintética seguramente también puede tener un efecto sobre el daño ocasionado por la enfermedad, aunque en este sentido la información no es concluyente. Diferentes trabajos sobre la interacción *Triticum aestivum*-*Puccinia tritici* bajo diferentes tratamientos de fertilización con nitrógeno afirman que no hay mayor daño sobre el aparato fotosintético, particularmente reducción de la fotosíntesis neta, cuando la disponibilidad de nitrógeno aumenta (Carretero *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2005). Sin embargo, si se incrementa la capacidad fotosintética, mejoraría la disponibilidad de fotoasimilados indispensables para que las plantas desarrollen las modificaciones morfológicas y fisiológicas que les permitan tolerar estreses bióticos y abióticos (Kreuzwieser *et al.*, 2002). Por otro lado, si bien altos contenidos de nutrientes aumentan la capacidad de desarrollar mecanismos de defensa de las plantas, también aumenta la disponibilidad de compuestos necesarios para el crecimiento de los patógenos, por lo que la incidencia de las enfermedades fúngicas foliares puede ser mayor en las plantas que crecen con mayor disponibilidad de nutrientes (Tavernier *et al.*, 2007).

Por lo tanto, es importante evaluar de manera integrada y en un mismo patosistema cómo son afectados los procesos fisiológicos a nivel de hoja en la interacción entre *Populus*

*deltoides*

y

*Melampsora*

*medusae*.

### **3.2- Objetivos e hipótesis.**

Objetivo 2: Analizar los cambios en ciertos parámetros fisiológicos a nivel foliar debido a la presencia de la enfermedad (y su interacción con la disponibilidad de nitrógeno) y poder correlacionar estos cambios con el grado de infección.

Hipótesis 2: La magnitud de los cambios ocurridos en los parámetros fisiológicos a nivel foliar se relaciona con el grado de infección.

### 3.3-Materiales y métodos.

#### 3.3.1- Ensayos.

Para cumplir con los objetivos planteados en este capítulo se utilizaron hojas provenientes de los ensayos 1 y 2, previamente descriptos en el capítulo 2.

#### 3.3.2- Mediciones fisiológicas.

Todas las mediciones fisiológicas que se describirán a continuación fueron realizadas en los meses de febrero y marzo, momento en el cual las plantas están en activo crecimiento, en hojas superiores completamente expandidas. En el caso de los tratamientos R+ se eligió de cada planta, la hoja que visualmente estaba más afectada. Para cada variable se midieron un mínimo de 5 plantas por tratamiento.

La fotosíntesis neta ( $A_{sat}$ ) se midió con un analizador de gases en infrarrojo (IRGA, CIRAS 2, PP Systems). Las mediciones se realizaron entre las 10:00 hs y las 15:00 hs, presumiblemente el período del día de mayor actividad fotosintética. Se comprobó que no existiera un patrón temporal a lo largo del día al comparar todas las mediciones efectuadas durante cada jornada de medición, de esta manera no fue necesario incluir en el análisis la hora del día en que se realizó la medición. La cámara del IRGA se configuró a una irradiancia de  $1500 \mu\text{m de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  de temperatura y una concentración de  $\text{CO}_2$  de 360 ppm. Luego de tomar el valor de fotosíntesis neta se desconectó la fuente de luz (irradiancia cercana a  $0 \mu\text{m de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), se dejó que las hojas se aclimataran por al menos 5 minutos y se midió respiración cuando la tasa de intercambio se encontraba estable, al menos durante 5 minutos.

Como la fotosíntesis neta medida con el IRGA tiene la interferencia de la liberación de  $\text{CO}_2$  por la respiración fúngica, para corroborar la caída en la fotosíntesis se midió al mediodía la tasa de transporte de electrones (ETR) mediante la medición de la fluorescencia de la clorofila con un medidor de la fluorescencia modulada de la clorofila a irradiancia natural y el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) luego de una aclimatación en

oscuridad de al menos media hora (FMS2, Hansatech Ltd.). Estas mediciones se realizaron en el mismo sector de hoja que se utilizó para medir con el IRGA.

Posteriormente, en el mismo sector de hoja, se determinó de forma no destructiva el contenido de clorofilas mediante un Spad (Minolta) que estima la concentración de clorofila total. También se utilizó un método destructivo para determinar el contenido de clorofila, para ello se sacó un disco de 0,5 cm de diámetro por hoja, y se extrajo la clorofila con N,N-Dimetilformamida durante un periodo de 24 hs en oscuridad y la posterior medición con espectrofotómetro (Inskeep & Bloom, 1985) para discriminar entre clorofila a y clorofila b.

La conductancia estomática (gs) se midió con un porómetro (Decagon SC1) por la mañana, entre las 10 hs y las 11 hs. En la primera medición realizada se midieron ambas caras. Como gs fue similar en ambas caras, se decidió medir sólo la cara superior para acortar el tiempo transcurrido entre mediciones.

Posteriormente, se tomó una fotografía para el conteo de pústulas y se guardó la muestra de hoja medida en un freezer de -80 °C para determinar el contenido de glucosamina (Anexo 2) para poder realizar las correlaciones entre los diferentes parámetros medidos y el grado de desarrollo de la enfermedad. La utilización del contenido de glucosamina como parámetro para cuantificar el grado de la infección se debe a que es un compuesto estructural de la pared celular de los hongos y no se encuentra en las hojas de las plantas cuando están libres de enfermedad.

La conductancia hidráulica de las hojas se midió con el método de la caída de presión a través de resistencias conocidas (Melcher *et al.*, 2012). Este método consiste en una cabeza hidráulica conectada al pecíolo de la hoja mediante un microtubo de silicona. Entre la cabeza hidráulica y el pecíolo se coloca un microtubo de resistencia conocida. Un sensor de presión mide la caída de presión que se genera cuando el agua comienza salir a través de los estomas. De esta manera se calcula el flujo de agua y, luego de medir el potencial hídrico de la hoja, se puede calcular la conductancia hidráulica ( $K_{\text{hoja}}$ ). Para realizar las mediciones se utilizó agua bidestilada y degaseada. La cabeza hidráulica se colocó a aproximadamente 40 cm. Una vez conectada la hoja, que se mantuvo iluminada durante el tiempo de la medición para evitar el cierre estomático, se dejó estabilizar y la medición se realizó cuando el flujo se mantuvo estable al menos durante 2 minutos. Inmediatamente después, la hoja fue guardada en una bolsa hermética en oscuridad, se la dejó estabilizar durante 5 minutos y se midió el potencial hídrico con cámara de presión (Biocontrol). La fórmula para determinar  $K_{\text{hoja}}$  utilizada es:

$$K_{hoja} = \frac{(P_{m\acute{a}x} - P)}{(P - \Psi_{hoja}) \times R_c}$$

Donde  $P_{m\acute{a}x}$ =presión de la cabeza hidráulica;  $P$ =presión de la hoja cuando transpira;  $\Psi_{hoja}$ =potencial hídrico de la hoja;  $R_c$ =resistencia de los microtubos.

### 3.3.3- Análisis estadístico y presentación.

Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Duncan, ambos con una significancia del 95%. En el ensayo 1 los factores considerados fueron Clon (C) y Roya (R). En el ensayo 2 además se incorporó el factor nitrógeno (N). En todos los casos se analizaron las interacciones entre los factores.

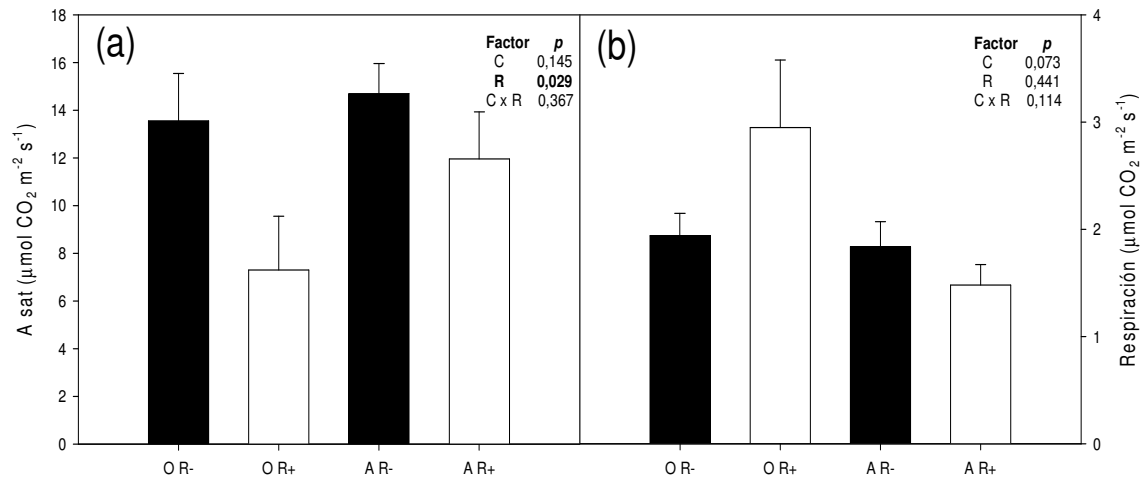
Se realizaron correlaciones entre las variables fisiológicas y la concentración de glucosamina, y entre la concentración de glucosamina y el número de pústulas. Se utilizaron los mismos datos de las mediciones fisiológicas con los cuales se realizaron las figuras. Las correlaciones se realizaron tomando los dos clones juntos, y luego para cada clon por separado. Se consideró que la correlación era significativa si  $p < 0,05$ .

Para la confección de las figuras se tomaron las medias y los errores estándar provenientes de los ANOVA realizados. Además, los valores de  $p$  derivados del ANOVA se muestran en la figura resaltándose en negrita el factor o los factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) (dentro del gráfico sobre la parte superior). Cuando fue necesario, se agregó a la figura (a la derecha del gráfico) el/los test de Duncan.

### 3.4- Resultados.

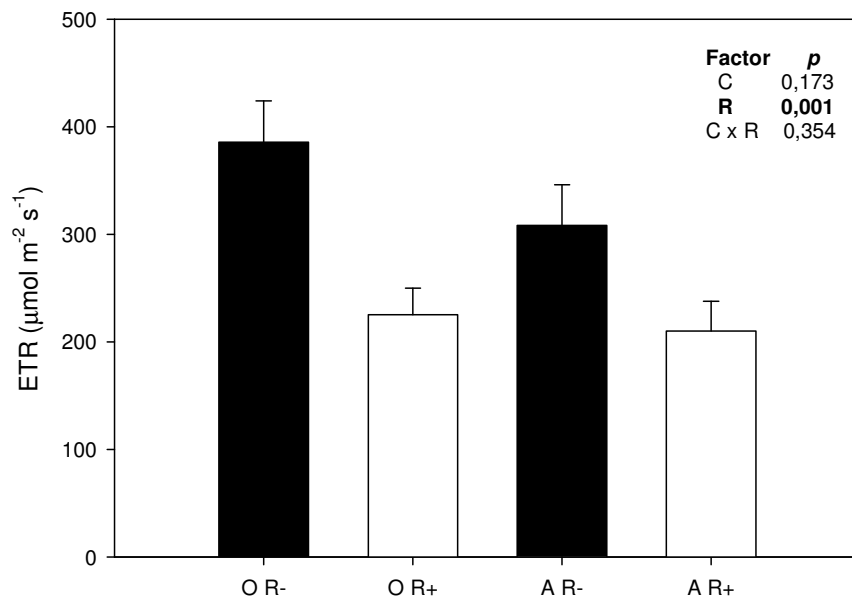
#### 3.4.1- Ensayo 1.

En la temporada 2010-2011 se observó que la roya redujo significativamente la fotosíntesis neta. En el clon Onda la reducción en la fotosíntesis neta fue del 45 % mientras que en el clon ‘Australiano 106/60’ fue del 19% (Figura 1a). En contrapartida, si bien no fue estadísticamente significativo, hubo un aumento de la respiración de las hojas de las plantas enfermas del clon Onda, pero no en el clon ‘Australiano 106/60’ (Figura 1b).

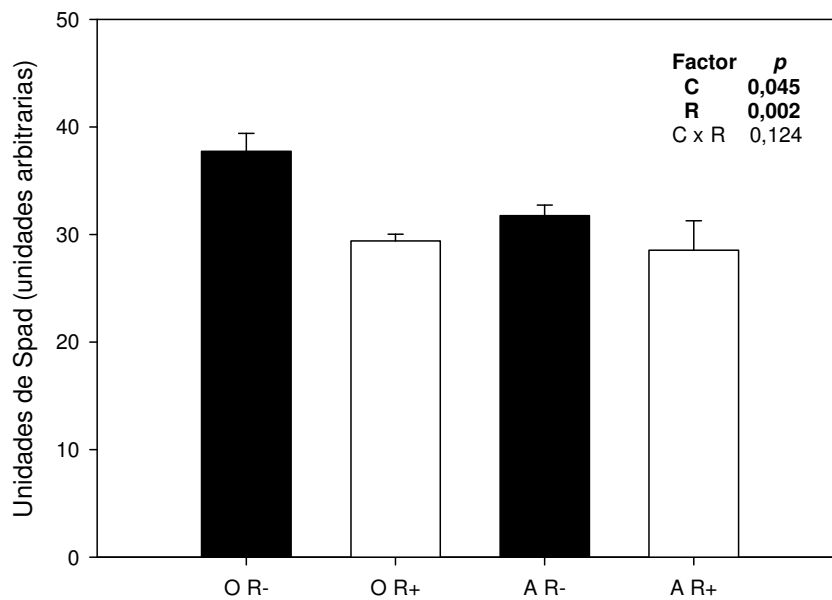


**Figura 1:** (a) Fotosíntesis neta (A sat) y (b) respiración en la oscuridad de hojas de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon ‘Australiano 106/60’ (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

Esta disminución en la fotosíntesis neta estuvo asociada a una disminución en la tasa de transporte fotosintético de electrones (ETR) y en el contenido de clorofilas. ETR disminuyó en ambos clones en las hojas enfermas. La reducción fue mayor en el clon Onda (42 %) al compararla con el clon ‘Australiano 106/60’ (32 %) (Figura 2). El contenido de clorofilas también presentó el mismo patrón: en el clon Onda la disminución en el contenido de clorofilas fue del 22 % mientras que en el clon ‘Australiano 106/60’ fue del 10 % (Figura 3). Además, el contenido de clorofilas fue mayor en el clon Onda que en el ‘Australiano 106/60’.



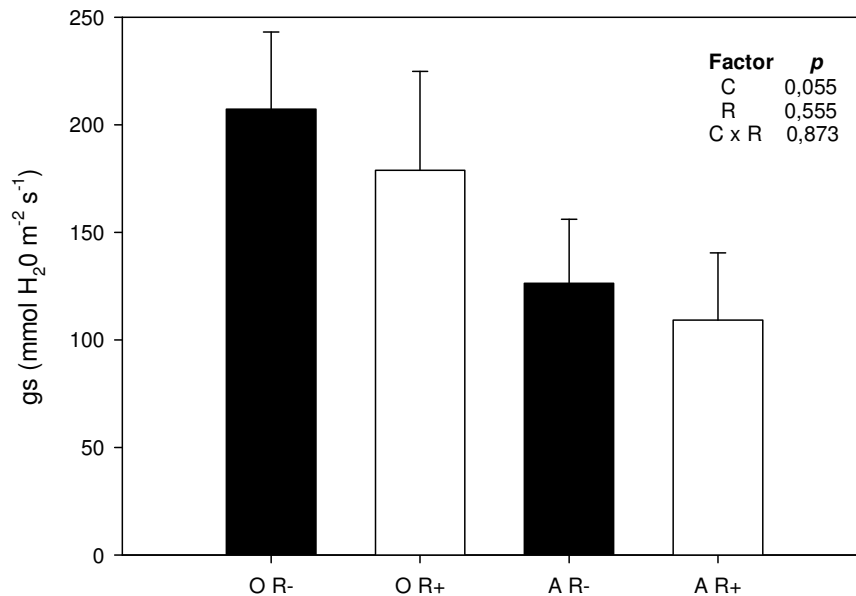
**Figura 2:** Tasa de transporte de electrones del fotosistema II (ETR) de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de *p* derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



**Figura 3:** Contenido de clorofilas a través de las unidades arbitrarias del Spad de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de *p* derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



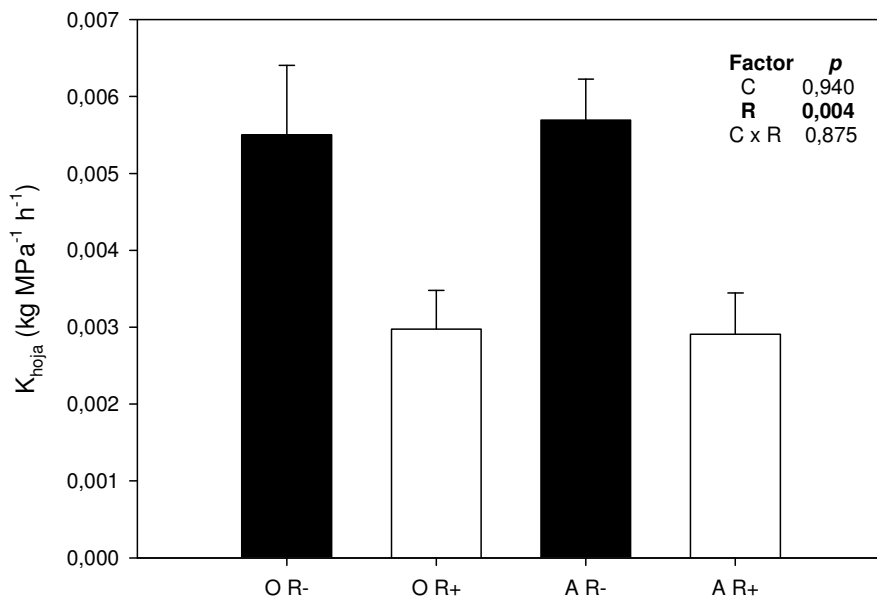
No hubo diferencias estadísticamente significativas en la conductancia estomática ( $g_s$ ) entre los diferentes tratamientos, posiblemente porque existió mucha variabilidad en los datos. Sin embargo,  $g_s$  de las hojas de las plantas enfermas tiende a ser menor que en las hojas de las plantas sanas (Figura 4).



**Figura 4:** Conductancia estomática de la hoja ( $g_s$ ) de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de  $p$  derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

En las mediciones realizadas en la temporada 2011-2012 todas estas variables medidas (fotosíntesis neta, respiración, contenido de clorofilas, y conductancia estomática) presentaron valores similares a los medidos en la temporada 2010-2011 (Anexo 1, figuras 1 a 4).

En la temporada 2011-2012 también se midió la conductancia hidráulica de la hoja. La presencia de la enfermedad redujo la conductancia hidráulica de la hoja, siendo la reducción del 45 % para el clon Onda y del 50 % para el clon 'Australiano 106/60' (Figura 5).

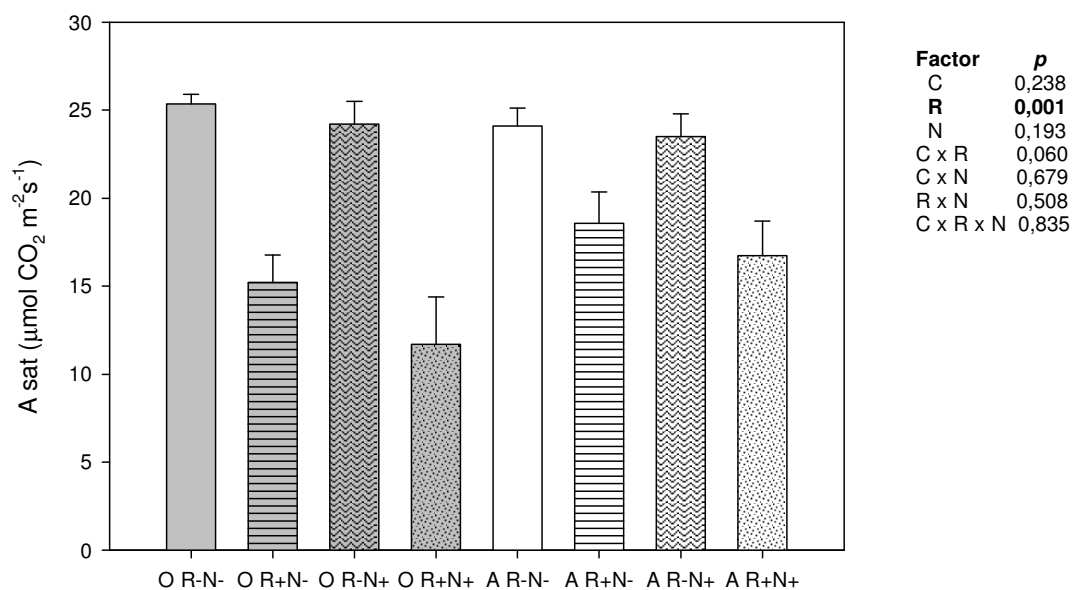


**Figura 5:** Conductancia hidráulica de la hoja ( $K_{hoja}$ ) de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

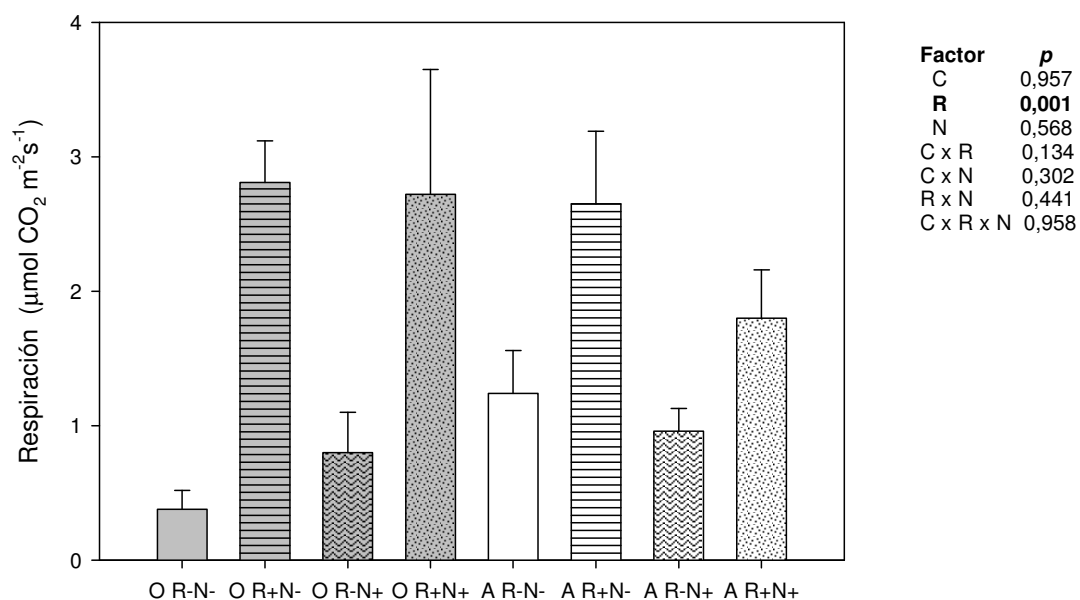
### 3.4.2- Ensayo 2.

En este ensayo, donde las condiciones fueron más controladas debido a su carácter de ensayo en macetas, los resultados obtenidos van en concordancia con los obtenidos en el ensayo 1. La fotosíntesis neta no fue modificada por la mayor disponibilidad de nitrógeno, pero fue menor en las hojas de las plantas enfermas independientemente de los clones. Esta disminución fue del 40-52 % en el clon Onda y del 23-29 % en el clon 'Australiano 106/60' (Figura 6).

Tampoco hubo efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la respiración de las hojas, pero la respiración aumentó cuando las hojas presentaban la enfermedad. En el clon Onda el aumento en la respiración fue del 240-640 % mientras que en el clon 'Australiano 106/60' el aumento fue del 87-115 % (Figura 7).

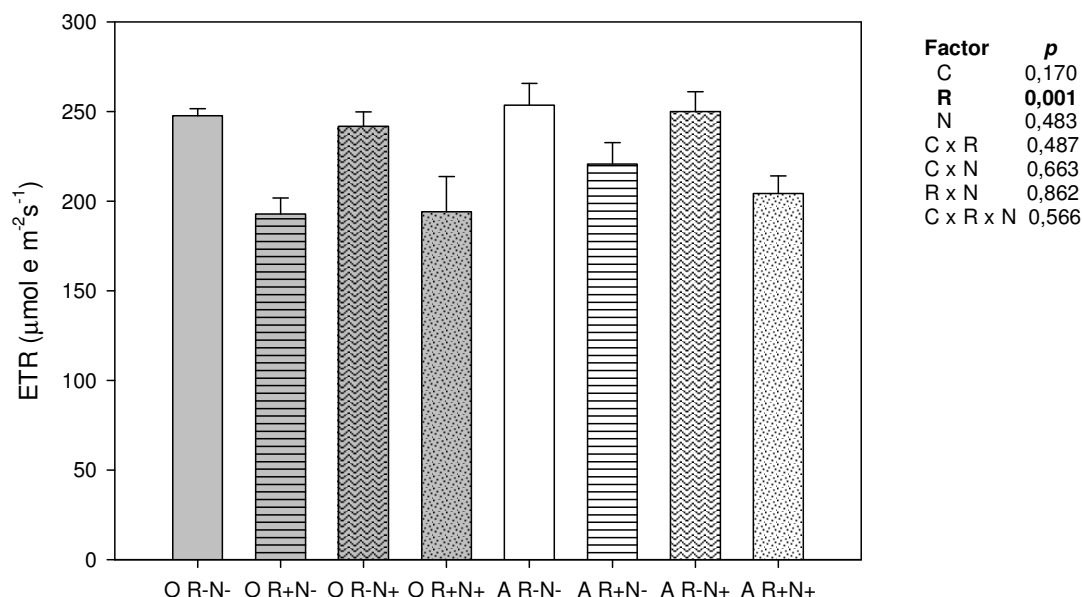


**Figura 6:** Fotosíntesis neta (A sat) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



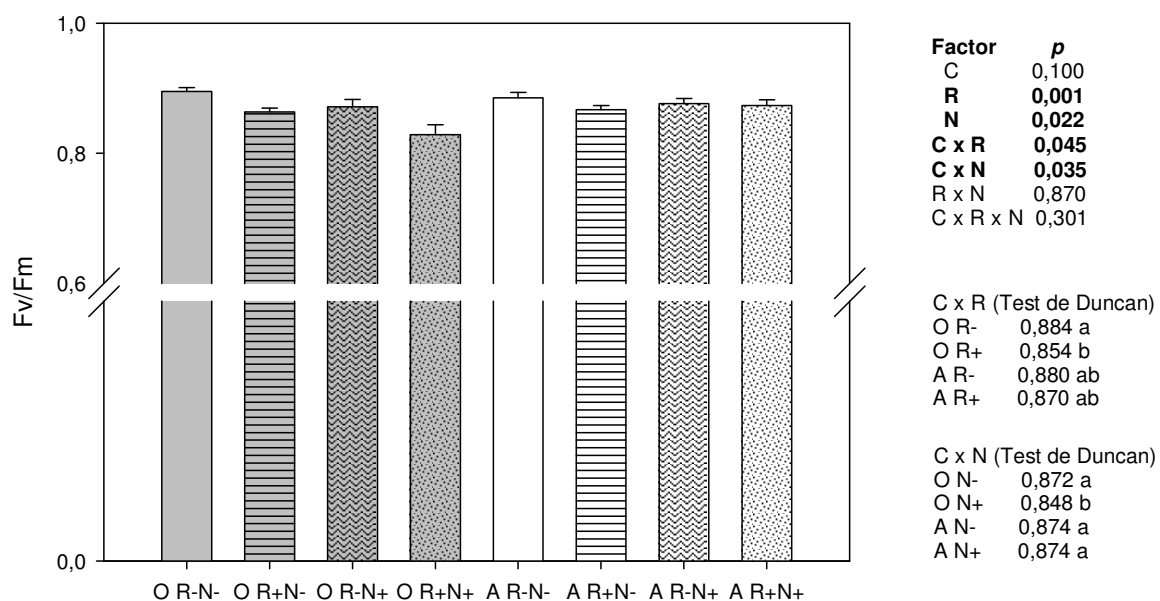
**Figura 7:** Respiración de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

La tasa de transporte fotosintético de electrones (ETR) no varió con la disponibilidad de nitrógeno, pero disminuyó cuando las hojas presentaron roya en comparación a las hojas sanas, para ambos clones. La reducción fue del 20-22 % para el clon Onda y del 14-19 % para el clon 'Australiano 106/60' (Figura 8).



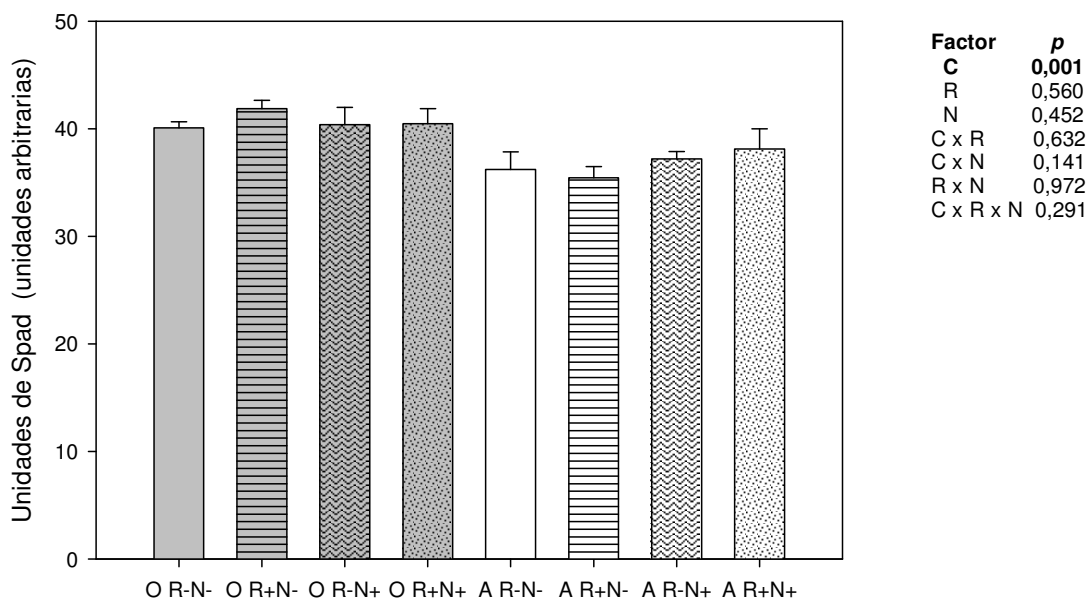
**Figura 8:** Tasa de transporte de electrones en el fotosistema II (ETR) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

En el caso del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, existió interacción entre los clones y la roya. Fv/Fm disminuyó en las plantas con nitrógeno del clon Onda en relación a las plantas sin nitrógeno, mientras que no hubo diferencias para el clon 'Australiano 106/60'. También existió una interacción entre los clones y la roya, para el clon 'Australiano 106/60' no hubo diferencias en Fv/Fm entre hojas de plantas sanas y enfermas pero para el clon Onda existieron diferencias. Hubo una disminución del 4 % en las hojas de las plantas enfermas en relación a las plantas sanas (Figura 9).



**Figura 9:** Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

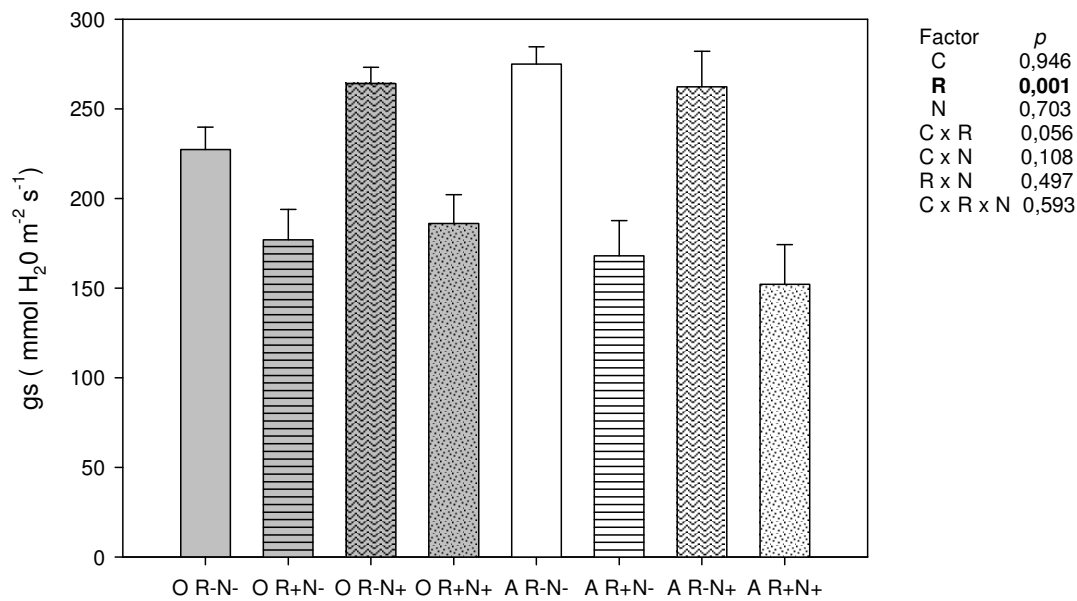
El contenido de clorofilas fue diferente entre los clones, mayor en el clon Onda que en el 'Australiano 106/60'. No hubo diferencias debido a la disponibilidad de nitrógeno ni a la roya (Figura 10). Al mismo resultado se llegó utilizando el método de extracción con N,N-Dimetilformamida, que demuestran que no hay diferencias en los contenidos totales de clorofilas ni en los contenidos de clorofilas a y b (Anexo 1, Figura 5).



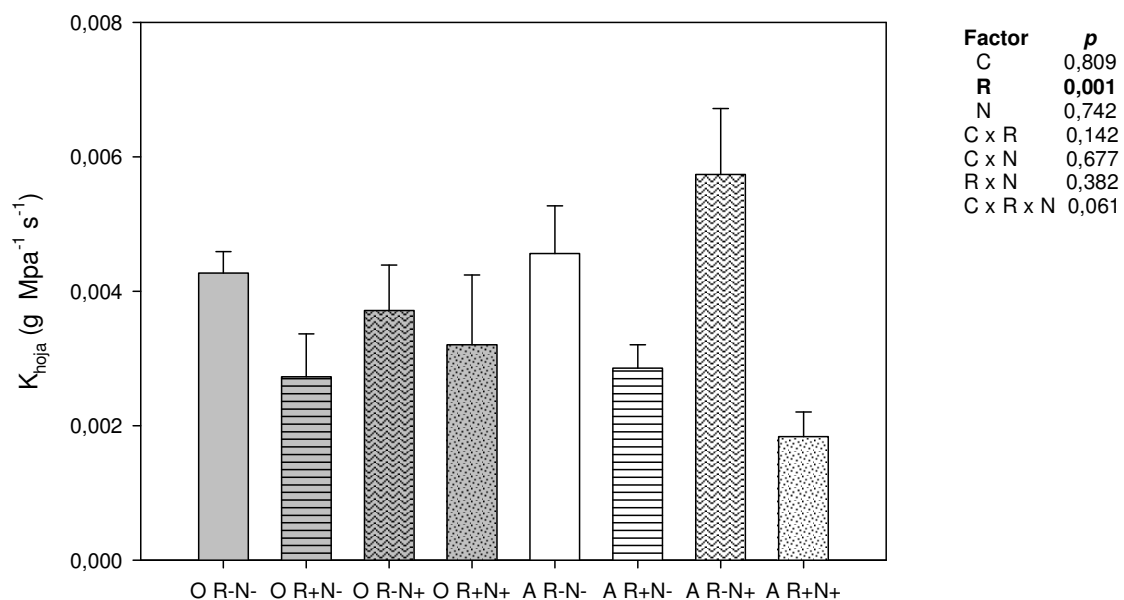
**Figura 10:** Contenido de clorofilas a través de las unidades arbitrarias del Spad de los diferentes tratamientos en el ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

La conductancia estomática no se modificó en función de la disponibilidad de nitrógeno pero sí por la presencia de la infección por roya. Hubo una disminución en  $g_s$  en las hojas enfermas en comparación a las hojas sanas. Esta disminución fue del 23-30 % en el clon Onda y del 39-42 % en el clon 'Australiano 106/60' (Figura 11).

El mismo comportamiento presentó la conductancia hidráulica de la hoja. No hubo efecto de la disponibilidad de nitrógeno pero sí de la infección por roya. En este sentido, la reducción en la conductancia hidráulica fue del 15-26 % en el clon Onda y del 40-68 % en el clon 'Australiano 106/60' (Figura 12).



**Figura 11:** Conductancia estomática (gs) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



**Figura 12:** Conductancia hidráulica de la hoja ( $K_{hoja}$ ) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

### 3.4.3- Relación entre los cambios en los parámetros medidos y el nivel de infección.

En el ensayo 1 se observó una correlación negativa ( $r=-0,49$ ) entre la concentración de glucosamina y el contenido de clorofilas (Spad), que se mantuvo estadísticamente significativa cuando analizamos ambos clones por separado. También existió correlación negativa entre glucosamina y ETR ( $r=-0,62$ ) en el clon Onda. Asimismo, para el conjunto de los datos hay una correlación positiva entre la concentración de glucosamina y el número de pústulas ( $r=0,79$ ), la cual se mantiene en el caso del clon Onda tomado individualmente ( $r=0,84$ ) (Tabla 1).

Cuando las correlaciones se realizaron entre los diferentes parámetros medidos y la concentración de glucosamina del ensayo 2, nuevamente sin discriminar por clon, obtuvimos que para la mayoría de los parámetros las correlaciones son estadísticamente significativas. Estas correlaciones son negativas para Fv/Fm, ETR y Asat mientras que para la respiración la correlación es positiva. Estas correlaciones se mantienen e incluso mejoran cuando el clon Onda se analiza por separado. Sin embargo, para el clon 'Australiano 106/60', la única correlación que es estadísticamente significativa es entre la concentración de glucosamina y A sat. Para el conjunto de los datos y para ambos clones por separado existe una correlación positiva entre la concentración de glucosamina y el número de pústulas (Tabla 2).

**Tabla 1:** Correlaciones entre el grado de enfermedad, cuantificado a través de la concentración de glucosamina, y las variables fisiológicas medidas en el ensayo 1 (a campo). Tasa de transporte de electrones (ETR), Spad, fotosíntesis neta (A sat), respiración y pústulas. Se muestran en negrita aquellas correlaciones que son estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).

	Ambos clones	Clon Onda	Clon 'Australiano 106/60'
	Glucosamina	Glucosamina	Glucosamina
ETR	-0,32	<b>-0,62</b>	-0,03
Spad	<b>-0,49</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,67</b>
A sat	0,02	-0,12	0,25
Respiración	0,05	0,08	0,21
Pústulas	<b>0,79</b>	<b>0,84</b>	0,33



**Tabla 2:** Correlaciones entre el grado de enfermedad, cuantificado a través de la concentración de glucosamina, y las variables fisiológicas medidas en el ensayo 2 (en macetas, con N). Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm), tasa de transporte de electrones (ETR), Spad, fotosíntesis neta (A sat), respiración y pústulas. Se muestran en negrita aquellas correlaciones que son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

	Ambos clones	Clon Onda	Clon 'Australiano 106/60'
	Glucosamina	Glucosamina	Glucosamina
Fv/Fm	<b>-0,34</b>	<b>-0,37</b>	0,10
ETR	<b>-0,51</b>	<b>-0,58</b>	-0,14
Spad	0,04	-0,09	-0,37
A sat	<b>-0,58</b>	<b>-0,62</b>	<b>-0,42</b>
Respiración	<b>0,29</b>	<b>0,43</b>	0,11
Pústulas	<b>0,62</b>	<b>0,59</b>	<b>0,63</b>

### 3.5-Discusión.

De los resultados obtenidos se desprende que la roya produce cambios muy profundos en la fisiología de las hojas. Hay una disminución de la fotosíntesis neta (Figuras 1a y 6) en las hojas de ambos clones cuando tienen roya, y queda en evidencia la susceptibilidad diferencial de los clones ya que en el clon 'Australiano 106/60' la disminución es del 20 % mientras que en el clon Onda es de 50 %. Estos porcentajes de reducción se encuentran dentro del rango de lo reportado para otras interacciones planta-patógeno: 50 % en hojas de *Salix* sp. infectadas con roya (Toome *et al.*, 2009), entre el 25 % y el 47 % en acículas de *Picea abies* afectadas por *Chrysomyxa rhododendri* (Mayr *et al.*, 2001); entre un 26 % y 47 % en hojas de híbridos de *Saccharum* spp. afectadas por *Puccinia kuehnii* (Zhao *et al.*, 2011) y de hasta un 80 % en hojas de *Phaseolus vulgaris* afectado por *Uromyces appendiculatus* (Bassanezi *et al.*, 2001). Al mismo tiempo se produce un aumento de la respiración (Figuras 1b y 7), aunque no se puede discriminar con la metodología utilizada en qué medida si dicho aumento se debe a un aumento de la respiración por parte del hospedante o del patógeno. El aumento en la respiración es más notable en el clon Onda. Por lo tanto, este aumento en la respiración explica sólo en parte la disminución observada en la fotosíntesis neta. Sin embargo, la magnitud de la respiración representa un 20 % de la fotosíntesis neta en hojas enfermas y un 4 % en hojas sanas. La reducción en la fotosíntesis neta como consecuencia de la enfermedad es mayor a esos porcentajes en cualquier tratamiento, siendo evidente que la fotosíntesis bruta también se reduce.

De los resultados obtenidos podemos afirmar que la disminución en la fotosíntesis neta también puede ser explicada en parte como consecuencia de un desmantelamiento en el aparato fotosintético y la pérdida de su capacidad para fijar carbono. Los contenidos de clorofilas se reducen entre un 10 % y un 20 % cuando las hojas presentan roya (Figura 3). También hay una disminución en la tasa de transporte fotosintético de electrones (Figuras 2 y 8) y ese daño es permanente en el clon Onda ya que cuando las hojas son aclimatadas en oscuridad el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) es menor al de las hojas sanas (Figura 9). En plantas de *Populus cathayana* infectas con roya se produjo una reducción en Fv/Fm entre el 3 % y el 8 % dependiendo del grado de infección (Zhang *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos mediante técnicas de fluorescencia por Zhang *et al.* (2009) permiten complementar los resultados obtenidos mediante la metodología de intercambio gaseoso

utilizada para medir la fotosíntesis (IRGA), en la cual no se puede discriminar el origen del CO<sub>2</sub> liberado y, por lo tanto, la contribución de la respiración fúngica a la disminución aparente de la fotosíntesis neta de las hojas.

Sin embargo, la disminución en la fotosíntesis neta parece ser de mayor magnitud de lo que se observa en la reducción de clorofila o en ETR, por lo que evidentemente la enfermedad también afecta el intercambio de gases por otros mecanismos. Por ejemplo, desde otro punto de vista, podemos relacionar la disminución en la fotosíntesis neta con una mayor dificultad en el intercambio gaseoso a través de los estomas. La conductancia estomática se reduce considerablemente en hojas con roya al compararlas con hojas sanas (Figuras 4 y 11), como así también hay una disminución en la conductancia hidráulica de la hoja (Figuras 5 y 12). La conductancia estomática también se redujo fuertemente en dos híbridos de *Populus sp.* (*P. nigra*-*P. maximowiczii* y *Populus deltoides* x *P. nigra*) infectados con *Marssonina brunnea*, pasando de 0,8 a 0,2 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Erickson *et al.*, 2004). Es posible que la respiración del hongo incremente la concentración intercelular de CO<sub>2</sub>, y este incremento podría contribuir a reducir la conductancia estomática (Lopes & Berger, 2001; Mandal *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). No puede descartarse, por otra parte, que la reducción en gs también se deba a que la colonización de los espacios intercelulares del mesófilo y de la cámara subestomática por hifas entorpezca la normal circulación del agua (Herre *et al.*, 2005).

En el ensayo 1, junto a la disminución en la fotosíntesis neta, hay una disminución en la tasa de transporte de electrones, en el contenido de clorofilas, en la conductancia estomática (aunque no es significativa) y en la conductancia hidráulica de la hoja. En cambio, en el ensayo 2, la fuerte disminución en la fotosíntesis neta está asociada con la reducción (más leve) en ETR, Fv/Fm y no hay disminución en el contenido de clorofilas, pero es muy marcada la disminución de la conductancia estomática y de la conductancia hidráulica de la hoja. Por lo que podemos suponer que la fotosíntesis se ve afectada primeramente por el intercambio gaseoso a nivel estomático, y que la pérdida en la integridad del aparato fotosintético es posterior.

La fertilización con nitrógeno, prácticamente no produjo cambios en los parámetros fisiológicos medidos. No hubo aumentos en la fotosíntesis neta, en el contenido de clorofilas, ni en ETR en las hojas de plantas sanas y fertilizadas al compararlas con hojas de plantas sanas pero no fertilizadas. Sin embargo, no siempre un aumento en la disponibilidad de nutrientes se refleja en cambios en la fisiología foliar sino que puede aumentar las reservas de nutrientes en tallos, raíces y hojas (Rennenberg *et al.*, 2010). Otras veces, si el contenido de nitrógeno es

suficiente para mantener una alta tasa fotosintética, un aumento adicional en la disponibilidad de nitrógeno aumenta el área foliar y el crecimiento sin cambios evidentes en la fisiología de la hoja (Cooke *et al.*, 2005). En el capítulo anterior demostramos que ambos clones respondieron a una mayor disponibilidad de N produciendo mayor biomasa. El hecho de no encontrar diferencias en la fotosíntesis al aumentar la disponibilidad puede deberse a que, incluso con baja disponibilidad de N, la tasa de fotosíntesis neta es alta. Para ambos clones la fotosíntesis neta se encuentra en aproximadamente  $25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , superior a la reportada en otros casos donde la fotosíntesis neta de *Populus deltoides* respondió a la fertilización, pero no superó con ninguna dosis de N los  $20 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Li *et al.*, 2014).

La mayor disponibilidad de nitrógeno en la planta puede favorecer el desarrollo de roya. Cuando aumenta la disponibilidad de nitrógeno debido a la fertilización, se observa un aumento en la producción de esporas (Robert *et al.*, 2002), como así también, un aumento en la densidad de pústulas y se acorta el periodo de latencia de la enfermedad (Jensen & Munk, 1997). Sin embargo, en los dos clones, los niveles de severidad fueron similares en las plantas con baja y alta disponibilidad de nitrógeno. Consistentemente, la fertilización no modificó el nivel de daño ocasionado por roya, resultado similar a los reportados para trigo (Carretero *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2005).

Por último, cuando asociamos los cambios en los parámetros medidos, con el nivel de infección en ambos clones en conjunto, las correlaciones son más fuertes en el ensayo en macetas (Tabla 2) que en ensayo a campo (Tabla 1). Posiblemente las plantas en el ensayo de campo se encuentran sometidas a otros factores de estrés (además de la roya) los cuales no son controlables, como el estrés hídrico o térmico, y de esta manera se diluye en parte el efecto ocasionado por la roya a nivel foliar. Cuando hacemos la comparación entre los clones, las correlaciones prácticamente desaparecen en el clon 'Australiano 106/60' mientras que en el clon Onda siguen siendo muy fuertes. Esto podría explicarse porque las variaciones observadas en los parámetros medidos en el clon 'Australiano 106/60' se desarrollaron en un muy pequeño rango de variación en la concentración de glucosamina, mientras que para el clon Onda la variación en la concentración de glucosamina es más amplia, debido a su condición de clon más susceptible a roya. Los niveles de ajuste obtenidos son más bajos que los obtenidos para híbridos de *Populus ssp.* infectados por *Marssonina brunnea* en que se observó una alta correlación entre la fotosíntesis neta y la severidad de la enfermedad ( $R^2=0,82-0,87$ ). Sin embargo, en este caso no se encontró correlación entre la respiración y la severidad (Erickson *et al.*, 2004). También, el nivel de ajuste encontrado para fotosíntesis neta y la concentración de clorofila fue menor al encontrado en hojas de caña de azúcar al

aumentar la severidad de la roya,  $R^2=0,84$  y  $R^2=0,78$  respectivamente (Zhao *et al.*, 2011) y al reportado para la fotosíntesis neta y  $F_v/F_m$  en hojas de *Phaseolus vulgaris* con roya al aumentar la severidad,  $R^2=0,88$  y  $R^2=0,35$  respectivamente (Bassanezi *et al.*, 2002; Bassanezi *et al.*, 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta ciertas consideraciones al comparar los resultados de esta tesis con los ejemplos anteriores. En todos los casos la determinación del grado de infección (severidad) fue determinada por observación de pústulas, mientras que en nuestro caso el nivel de la enfermedad fue estimado por la concentración de glucosamina, siendo éste un método más objetivo. Otra diferencia es que en los trabajos citados, la presencia de la enfermedad se produce por inoculación artificial, donde se controla el nivel inicial de la infección y además, sólo se trata de un ciclo de la enfermedad. Contrariamente, en nuestros ensayos, la inoculación se produce de forma natural, por lo que en el momento en que se hacen las mediciones se encontrarían en las hojas hifas y estructuras reproductivas del hongo en diferente estado de desarrollo.

### **3.6-Conclusiones.**

La roya produce una disminución de la fotosíntesis neta, de la tasa de transporte fotosintético de electrones y del contenido de clorofilas.

La roya produce una disminución en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II sólo en el clon Onda, el más susceptible.

La roya produce un aumento de la respiración en los clones analizados

La roya produce una disminución en la conductancia estomática y en la conductancia hidráulica de la hoja.

Un aumento en la disponibilidad de nitrógeno a través de la fertilización, no aumenta el daño ocasionado por la roya.

La magnitud en los cambios producidos se correlacionan con el nivel de infección (concentración de glucosamina), particularmente las correlaciones son más fuertes para el clon Onda.

## Capítulo 4: Alteraciones en la retraslocación de nutrientes.

#### 4.1-Introducción.

En el capítulo 2 demostramos que la infección por roya produce una disminución en el crecimiento. Como explicación parcial de este fenómeno, en el capítulo 3, vimos que la roya produce una pérdida de la capacidad fotosintética y del intercambio gaseoso en las hojas afectadas. Otra parte de la explicación se encontraría en los cambios producidos por la roya en la dinámica foliar y la retranslocación de nutrientes, como veremos en este capítulo.

La habilidad de los árboles para almacenar y redistribuir internamente los nutrientes es un elemento fundamental en la economía de los nutrientes. La distribución interna del nitrógeno (N), o ciclado, puede ser dividida en cuatro fases durante el año. Primero, la traslocación primaria del N desde los tejidos de absorción hacia las hojas en expansión. Segundo, la redistribución de los recursos nitrogenados resultado del reciclado metabólico del N durante la temporada de crecimiento. Tercero, la retranslocación del N desde los tejidos senescentes y acumulación en los tejidos perennes durante la senescencia otoñal. Cuarto, la removilización del N desde los tejidos perennes hacia los tejidos en activo crecimiento durante la brotación en primavera (Cooke & Weih, 2005).

Esta dinámica interna en la utilización del nitrógeno es afectada cuando las plantas presentan roya. Por un lado, la defoliación anticipada producida por la roya hace que el área foliar disminuya, y asociada a esta menor área foliar hay una disminución en la interceptación de luz y por ende la capacidad fotosintética del canopy (Cortizo, 2014). Por otro lado, la senescencia (y abscisión) de las hojas se puede producir con niveles más elevados de nutrientes que son retenidos por la biomasa fúngica, tal como se observó en trigo (Van Den Berg *et al.*, 2007), disminuyendo la redistribución y la retranslocación de dichos nutrientes a tejidos en crecimiento o tejidos de reserva (Silla & Escudero, 2004). Estas reservas de nutrientes condicionan el crecimiento al inicio de la primavera siguiente, ya que los nutrientes acumulados en las estructuras leñosas son los que sostienen el crecimiento al inicio de la brotación (Cooke & Weih, 2005).

La fertilización con nitrógeno, como ya hemos mencionado anteriormente, tiene un efecto contrario al producido por la roya. En este caso, un aumento en la disponibilidad de nitrógeno para la planta se traduce en un aumento en el número de hojas y en un retraso de la senescencia en las hojas (Cooke *et al.*, 2005). En cuanto a la redistribución y retranslocación de



N, desde una perspectiva de la economía de nutrientes, a medida que la disponibilidad en el suelo es menor es de esperar que la magnitud de estos procesos sea mayor (Vergutz *et al.*, 2012). Por lo tanto, es de esperar que la roya afecte en diferente magnitud la retranslocación de nutrientes desde las hojas a los tejidos de reserva, según la planta esté creciendo con baja o alta disponibilidad de nutrientes.

## **4.2- Objetivos e hipótesis.**

Objetivo 3: Analizar los cambios en la retranslocación de nutrientes a tejidos de almacenamiento debidos a la infección por roya.

Hipótesis 3.1: Las hojas atacadas por roya abscinden antes y con mayor contenido de nutrientes que hojas libres de roya.

Hipótesis 3.2: Las concentraciones y los contenidos de nutrientes en los tejidos de reserva son menores en plantas que han tenido roya.

Hipótesis 3.3: Si la disponibilidad de N en el suelo es mayor, la roya tiene menor impacto negativo en la acumulación de este nutriente en los tejidos de reserva.

### 4.3- Materiales y métodos.

#### 4.3.1- Ensayos.

Para cumplir con el objetivo planteado se utilizaron las plantas del ensayo 2, descripto en el capítulo 2.

#### 4.3.2- Determinaciones de N, proteínas y glucosamina.

Se analizó la concentración de nitrógeno en hojas completamente expandidas y senescentes de forma natural, de plantas infectadas y libres de roya. A medida que las hojas se fueron cayendo debido a la senescencia se recolectaron y secaron en estufa (60 °C) hasta peso constante. Para cada planta se realizó una muestra compuesta con un mínimo de 5 hojas. Se determinó el nitrógeno total mediante el método de semimicro Kjeldah (determinaciones efectuadas por el LANAIS N-15, CONICET-UNS (Agronomía), 8000 Bahía Blanca, Argentina). Este método consiste en una digestión con ácido sulfúrico y la posterior titulación con hidróxido de sodio (López Ritas & López Mérida, 1990). Otro set de hojas se guardó en freezer a -80 °C para la determinación posterior del contenido de glucosamina (anexo 2).

Desde el 15/4 hasta que las plantas se encontraron totalmente defoliadas se registró semanalmente el número total de hojas por planta.

Al final de la etapa de crecimiento, se analizó el contenido de nitrógeno en el tallo, raíces finas y raíces gruesas, con la misma metodología indicada en el párrafo anterior. Las muestras se tomaron de las plantas muestreadas para determinar materia seca (capítulo 2 figuras 9, 10 y 11). Dado que los pesos de cada compartimento son conocidos, se calculó el contenido total de nitrógeno de cada una de las plantas como el producto entre la concentración y el peso seco de cada compartimento.

Se determinó el contenido de proteínas mediante una adaptación del método colorimétrico de Lowry en tallos, raíces gruesas y finas. En tallos se realizó la separación de forma manual entre el xilema secundario (excluyendo la médula) y la corteza. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

- Se molió y homogeneizó la muestra en N<sub>2</sub> líquido.

- Se agregó el buffer de extracción (1 ml) a 60 mg de muestra, se pasó por el Vortex y se sonicó 8 min. Luego se centrifugó 12 min a 7500 g (2 veces).
- Al sobrenadante obtenido se le denominó “Extracto de proteína total”.
- Se agregó 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA, 20 % p/v) a 0,75 ml de Extracto de proteína total.
- Se dejó reposar 30 min a 4 °C y se centrifugó a 7500 g durante 10 min.
- El pellet se redisolvió en 7,5 ml de 0,1 M NaOH (“Pellets”).
- Una parte del sobrenadante (480 µl) se neutralizó con 256 µl de 1 M NaOH (“Sobrenadante”).
- Se tomó 230 µl de sobrenadante y se mezcló con 700 µl de reactivo de Lowry C. Posteriormente se incubó 15 min a 22 °C.
- Se agregó 70 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, se pasó por el Vortex rápidamente y se dejó reposar por 2 hs.
- Se leyó la absorbancia a 660 nm.
- La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino (BSA)

Buffer de extracción: 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5), 750 mM NaCl, 5 mM EDTA disódico y 28 mM bisulfito de sodio.

Reactivo de Lowry A: 2 % w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,4 % w/v NaOH y 0,16 % w/v Tartrato de Sodio y Potasio. Reactivo de Lowry B: 4 % w/v  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Reactivo de Lowry C: 100:1, A:B.

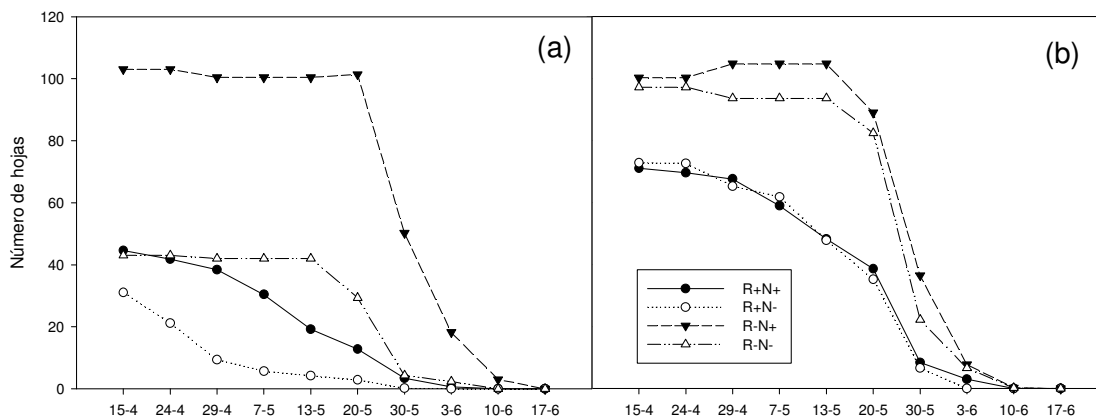
#### 4.3.3- Análisis estadístico y presentación.

Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Duncan, ambos con una significancia del 95%. Los factores considerados fueron clon (C), roya (R) y nitrógeno (N). En todos los casos se analizaron las interacciones entre los factores.

Para la realización de las figuras se tomaron las medias y los errores estándar provenientes de los ANOVA realizados. Además, los valores de p derivados del ANOVA se muestran en la figura resaltándose en **negrita** el factor o los factores estadísticamente significativos (dentro del gráfico sobre la parte superior). Cuando fue necesario, se agregó a la figura (a la derecha del gráfico) el/los test de Duncan.

#### 4.4- Resultados.

El número de hojas por planta fue influenciado por la presencia de roya y por la disponibilidad de nitrógeno en el clon Onda. Por un lado, al comenzar las mediciones el 15/4, las plantas R-N+ presentaban en promedio 103 hojas mientras que en el resto de los tratamientos el número de hojas no superaron las 45, es decir, un 60 % menor. En el tratamiento R-N- el número de hojas se mantuvo constante hasta el 13 de mayo mientras que en el tratamiento R-N+ permaneció constante por una semana más, y luego cayó marcadamente en ambos tratamientos. En los tratamientos R+ el número de hojas cayó constantemente desde el inicio de las mediciones, encontrándose estas plantas prácticamente sin hojas al momento en que comenzó la caída otoñal de las hojas en los tratamientos R- (Figura 1 a). Para el clon 'Australiano 106/60' sólo hubo efecto de la roya. Al comenzar las mediciones, los tratamientos R- presentaban aproximadamente 100 hojas por planta (97 hojas en R-N- y 103 hojas en R-N+), valores que se mantuvieron constantes hasta fines de mayo; a partir de esa fecha el número de hojas cayó abruptamente. En los tratamientos R+, al comienzo de las mediciones las plantas presentaban 72 hojas, un 40 % menos, y el número de hojas declinó constantemente desde el inicio de las mediciones (Figura 1 b).

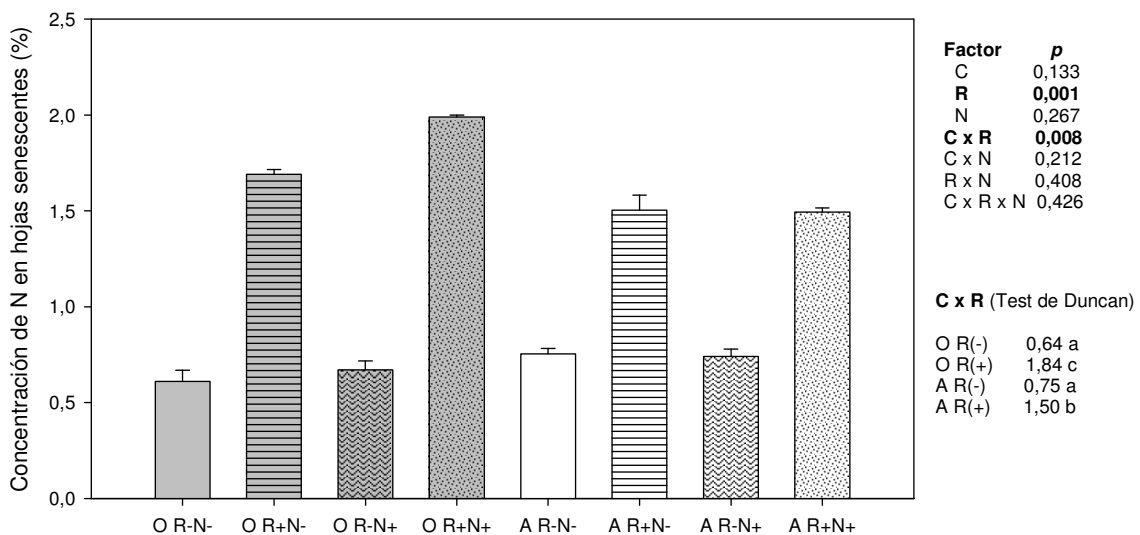


**Figura 1:** Evolución en el número de hojas a lo largo del tiempo para los diferentes tratamientos. Para el clon Onda (a) y el clon 'Australiano 106/60' (b). Con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+).

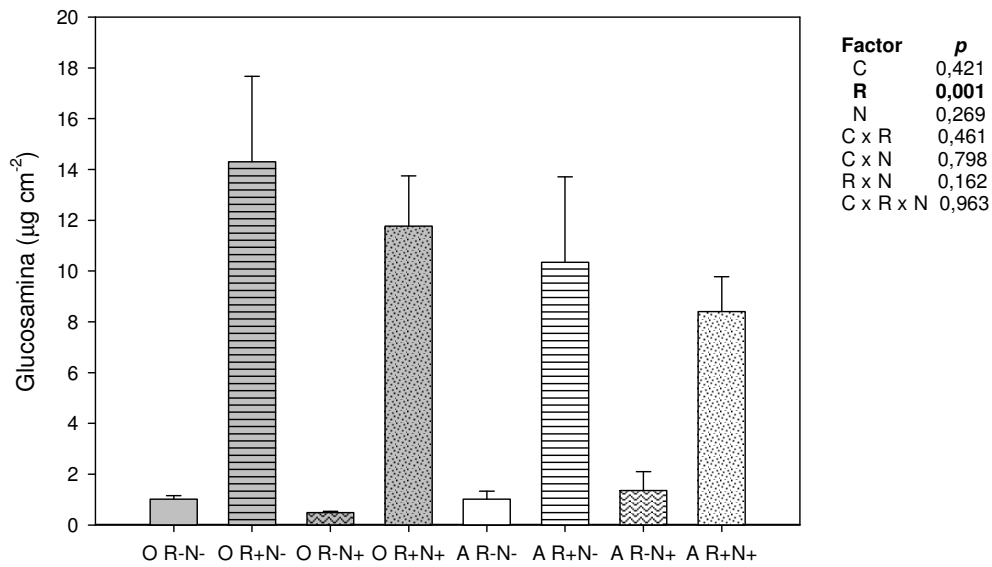
Cuando analizamos el contenido de nitrógeno de las hojas senescentes se detectó una interacción entre los clones y la roya; sin embargo, no hubo efecto de la disponibilidad de

nitrógeno. En hojas senescentes de plantas sanas, el contenido porcentual de nitrógeno fue similar en ambos clones. Las hojas senescentes presentaron una concentración del 0,64 % N y 0,74 % N para el clon Onda y 'Australiano 106/60', respectivamente. Mientras que las hojas senescentes de plantas con roya, presentaron un contenido mayor de nitrógeno. En este sentido, las concentraciones de N en las hojas senescentes de plantas enfermas fueron del 1,84 % N para el clon Onda y 1,49 % N para el clon 'Australiano 106/60' (Figura 2).

Asociado a esta mayor concentración de nitrógeno en las hojas senescentes con roya encontramos un aumento en el contenido de masa fúngica, expresado a través de la concentración de glucosamina. En este caso, no hubo efecto de la disponibilidad de nitrógeno ni del clon. La concentración de glucosamina de las hojas senescentes libres de roya no superó  $1,36 \mu\text{g cm}^2$ , mientras que cuando las hojas senescen con roya, la concentración de glucosamina se encuentra entre  $8,40$  y  $14,30 \mu\text{g cm}^2$  (Figura 3).

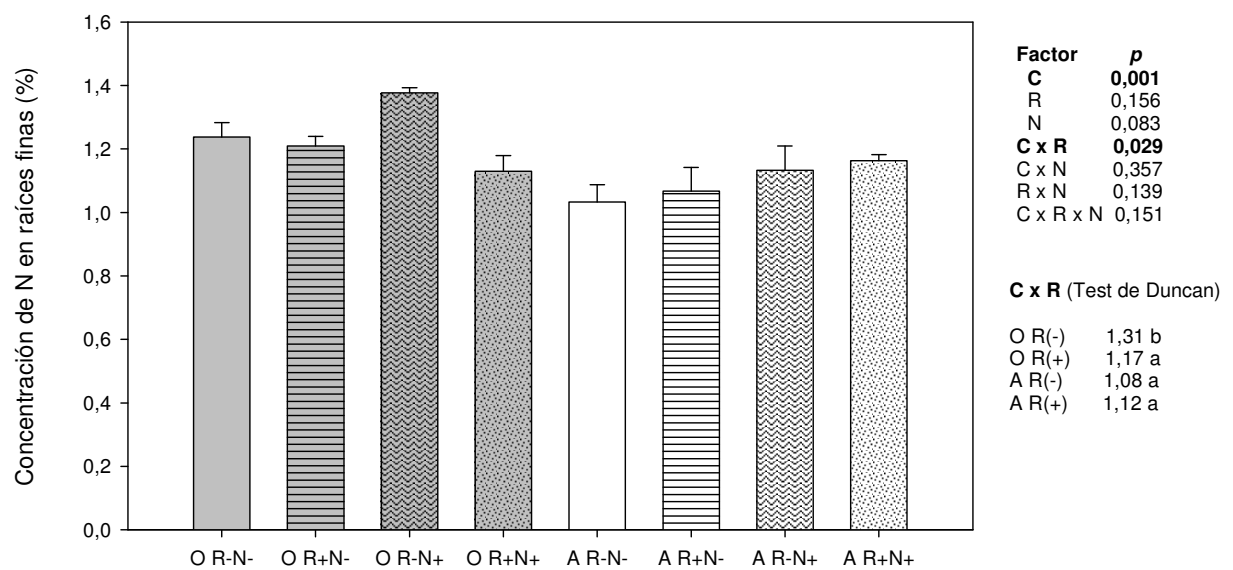


**Figura 2:** Concentración de nitrógeno (%) en hojas senescentes de forma natural para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen inferior derecho se presenta el test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondiente.

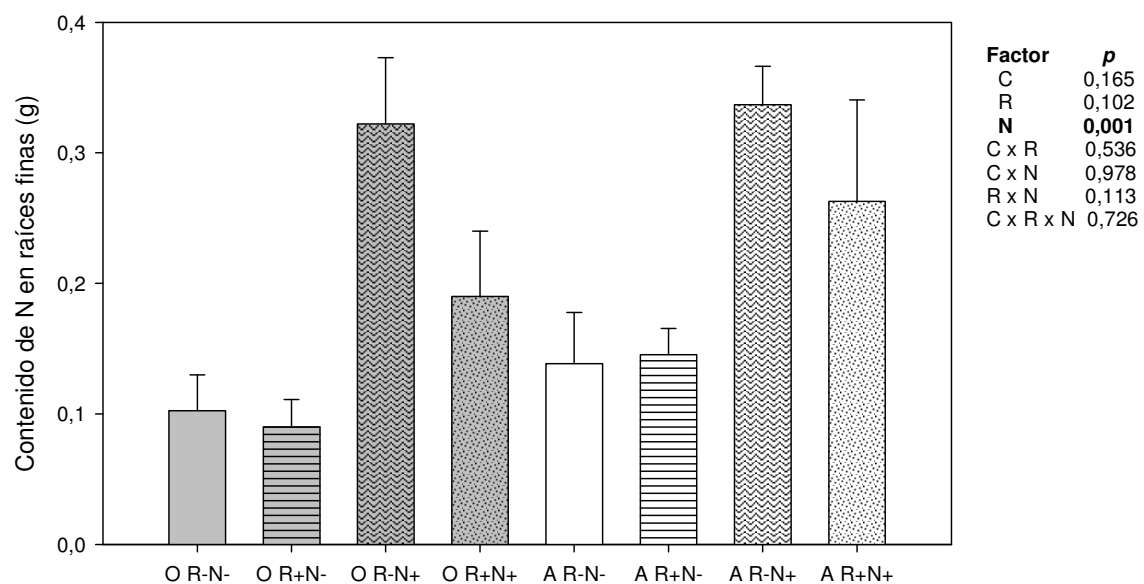


**Figura 3:** Concentración de glucosamina ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) en hojas completamente expandidas y senescentes de forma natural para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

La concentración de nitrógeno en raíces finas presentó una interacción entre el clon y la roya. En el clon 'Australiano 106/60', la concentración de nitrógeno en las raíces finas fue del 1,08 % N y 1,12 % N, para plantas con roya y sin roya respectivamente (diferencias no significativas), mientras que en el clon Onda, la concentración de nitrógeno en las raíces finas fue del 1,17 % N y 1,30 % N, para plantas con roya y sin roya (Figura 4). El contenido total de nitrógeno (esto es, el producto de la concentración de N por la biomasa) en las raíces finas fue modificado solamente por la disponibilidad de nitrógeno. Con baja disponibilidad de nitrógeno en el suelo, el contenido de nitrógeno en hoja fue de 0,12 g mientras que con alta disponibilidad de N en el suelo, el contenido de nitrógeno en hoja fue de 0,28 g (Figura 5).



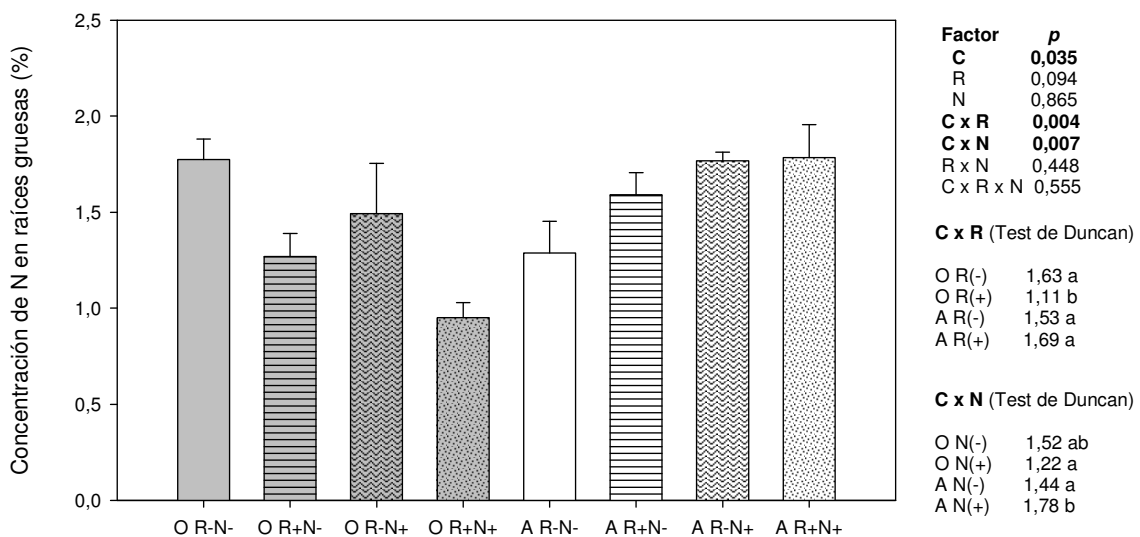
**Figura 4:** Concentración de nitrógeno (%) en raíces finas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Sobre el margen inferior derecho se presenta el test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondiente.



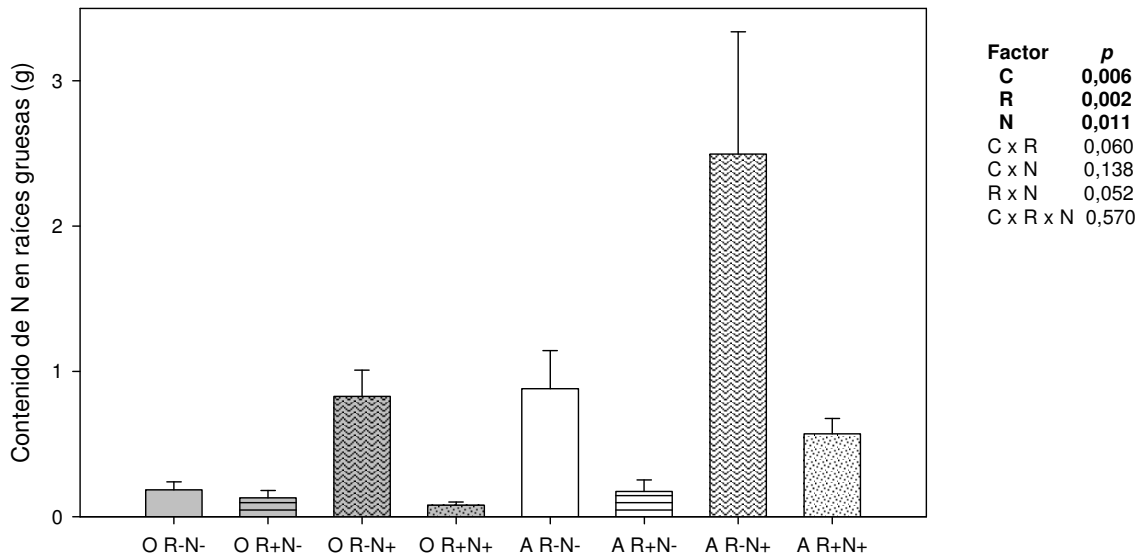
**Figura 5:** Contenido de nitrógeno total (g) en raíces finas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).



La concentración de nitrógeno en las raíces gruesas presentó interacción entre los clones y la roya, como también entre los clones y la disponibilidad de nitrógeno. De la interacción entre los clones y la roya resulta que en el clon Onda, la concentración de nitrógeno en las raíces gruesas fue del 1,63 % N en plantas sanas, disminuyendo hasta una concentración del 1,11 % N en las plantas enfermas; en el clon 'Australiano 106/60', la concentración de nitrógeno en raíces gruesas varió entre el 1,53 % N y 1,69 % N, sin diferencias significativas entre plantas sanas y enfermas. De la interacción entre los clones y la disponibilidad de nitrógeno se observa que en el clon Onda, la concentración de nitrógeno en las raíces gruesas disminuyó al aumentar la disponibilidad de nitrógeno, pasando de una concentración de 1,52 % a 1,22 %; y en el clon 'Australiano 106/60' ocurrió lo contrario, al aumentar la disponibilidad de nitrógeno aumentó la concentración de nitrógeno en las raíces gruesas, pasando de una concentración de 1,44 % a 1,78 % (Figura 6). El contenido de nitrógeno de las raíces gruesas fue afectado por el clon, la roya y la disponibilidad de nitrógeno. El contenido de nitrógeno es mayor en el clon 'Australiano 106/60' que en el Onda, mayor en plantas sin roya que con roya, y mayor en las plantas con nitrógeno que sin nitrógeno (Figura 7).

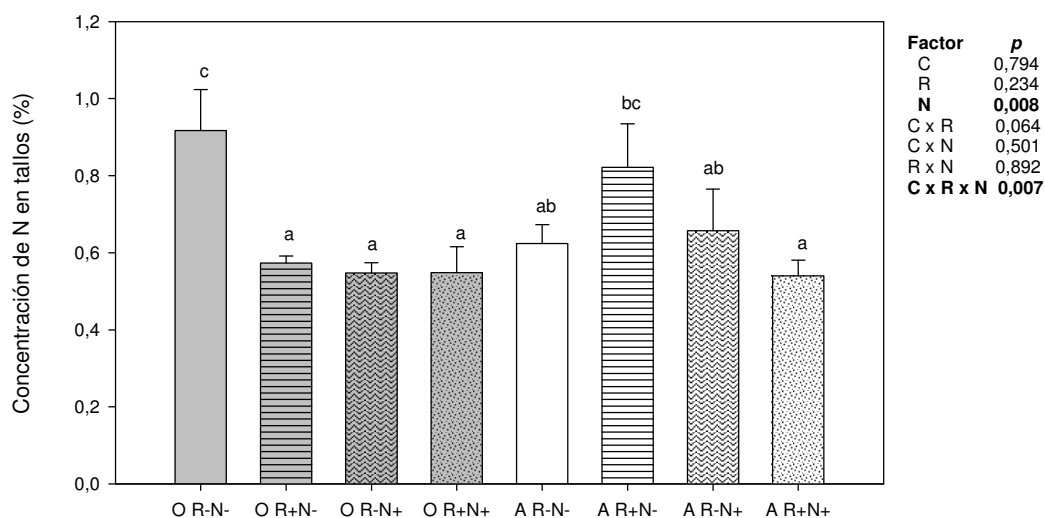


**Figura 6:** Concentración de nitrógeno (%) en raíces gruesas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos y los test de Duncan ( $p < 0,05$ ) correspondientes.

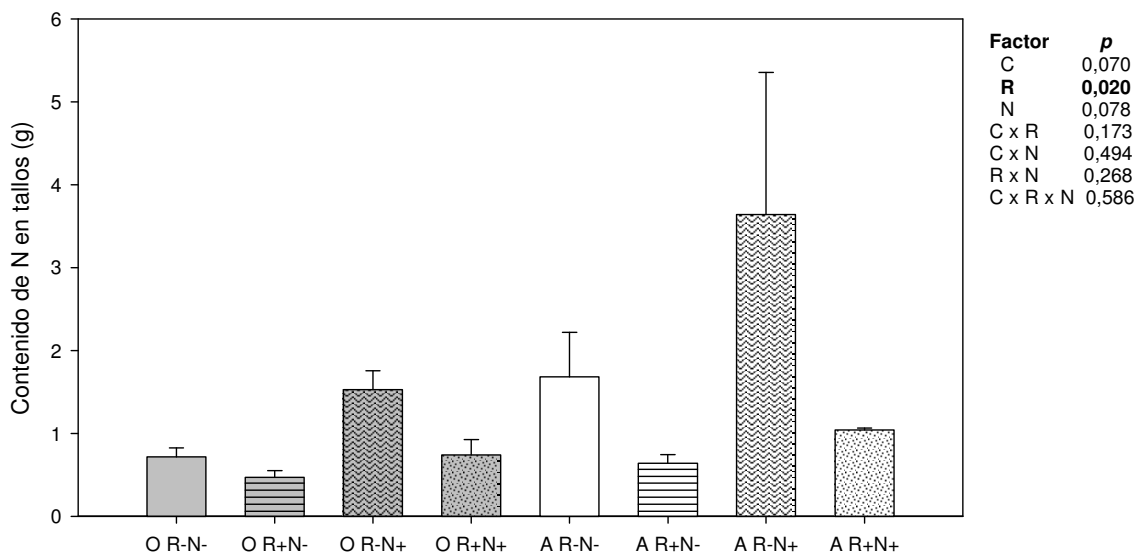


**Figura 7:** Contenido de nitrógeno total (g) en raíces gruesas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

En la concentración de nitrógeno en tallos, hubo una interacción entre los clones, roya y la disponibilidad de nitrógeno. Cuando las plantas del clon Onda crecieron con alta disponibilidad de nitrógeno, no hubo cambios en la concentración de nitrógeno debido a la roya, presentando valores del 0,54 % N. Cuando las plantas crecieron con baja disponibilidad de nitrógeno, la roya causó una reducción en la concentración de nitrógeno, pasando de una concentración del 0,91 % N a 0,57 % N al comparar plantas sanas y enfermas, respectivamente. En el clon 'Australiano 106/60' la concentración de N no se modificó en plantas sanas o enfermas tanto con alta como con baja disponibilidad de N (Figura 8). En el contenido de nitrógeno total en tallo sólo hubo efecto de la roya. Cuando las plantas se encontraron libres de roya, el contenido total de nitrógeno en tallos fue mayor que en plantas con roya (Figura 9).



**Figura 8:** Concentración de nitrógeno (%) en tallos para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas mediante el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Contenido de nitrógeno total (g) en tallos para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

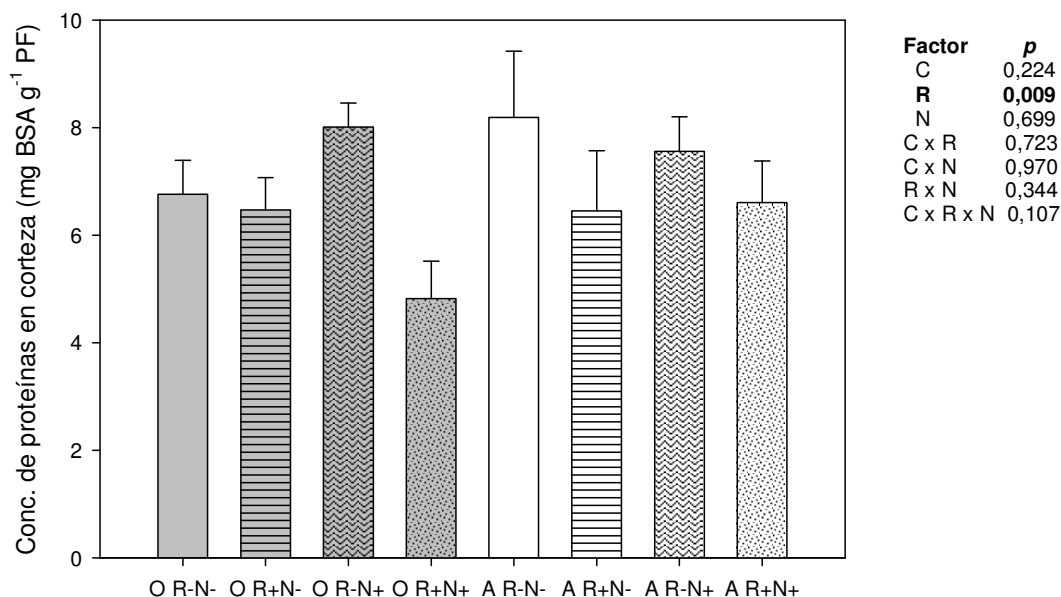
Al sumar los contenidos de N por compartimento se estimó un balance general del contenido de N en la planta. Hay un efecto del clon ( $p = 0,020$ ), del nitrógeno ( $p = 0,019$ ) y de la

roya ( $p=0,001$ ) pero no existen interacciones entre los factores (CxR,  $p=0,107$ ; CxN,  $p=0,308$ ; RxN,  $p=0,120$ ; CxRxN,  $p=0,567$ ). El contenido de N de la plantas con alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo es de 3,01 g mientras que en las plantas con baja disponibilidad fue de 1,34 g. Por otro lado, hay una fuerte reducción en el contenido de N en las plantas enfermas al compararlas con las plantas sanas, pasando de 3,12 g a 1,37 g (Tabla 1).

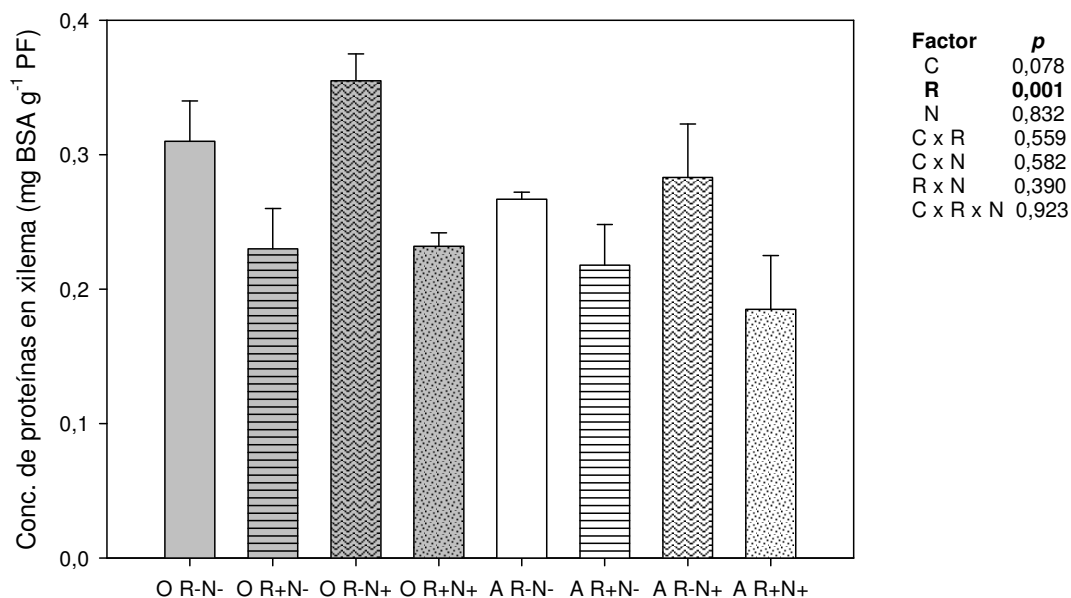
**Tabla 1:** Contenidos totales de N (g) por planta con sus respectivos errores estándar. Con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+).

Clon	R-N-	R+N-	R-N+	R+N+
Onda	1,00±0,2	0,69±0,1	2,66±0,4	1,01±0,2
'Australiano 106/60'	2,70±0,7	0,95±0,1	6,47±2,3	1,87±1,2

La concentración de proteínas en el tallo, discriminando entre la corteza y el xilema secundario, varió significativamente en respuesta a la roya. La concentración de proteínas en la corteza fue un 20% menor cuando las plantas tuvieron roya al compararlas con las plantas sanas (Figura 10). En el xilema secundario la reducción fue del 35% en las plantas enfermas (Figura 11). La concentración de proteínas en raíces finas y gruesas fue similar en todos los tratamientos (Anexo 1, figuras 6 y 7).



**Figura 10:** Concentración de proteínas (mg BSA g<sup>-1</sup> PF) en la corteza para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos (p<0,05).



**Figura 11:** Concentración de proteínas (mg BSA g<sup>-1</sup> PF) en el xilema secundario para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en

**negrita** los factores estadísticamente significativos ( $p<0,05$ ).

#### 4.5- Discusión.

La respuesta de la dinámica foliar a la disponibilidad de nitrógeno, de los clones utilizados es muy diferente. En el clon 'Australiano 106/60' no se modificó ni el número de hojas ni se retrasó la abscisión foliar al aumentar la disponibilidad de nitrógeno. En cambio, en el clon Onda, en plantas sanas, la fertilización con nitrógeno produjo un aumento del orden del 100% en el número de hojas y al mismo tiempo retrasó la abscisión de las mismas una semana (Figura 1). En un híbrido de *Populus trichocarpa x deltoides* fertilizado con dos dosis de N se observó, al igual que en el clon Onda, un aumento en el número de hojas ante un aumento en la disponibilidad de N en el suelo y un retraso en la senescencia, medida como caída en la concentración de clorofila (Cooke *et al.*, 2005). Por lo tanto, la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno depende fuertemente del material genético. Esto es esperable cuando los clones utilizados presentan una arquitectura muy diferente. Cuando analizamos la dinámica foliar, concentrándonos en los efectos de la roya, la respuesta es similar en ambos clones. Las plantas con roya tienen menos hojas y éstas abscinden antes que en las planas sanas. Resultados similares se encontraron para ambos clones en ensayos en el Delta (Cortizo, 2014). Asimismo, en 2 híbridos de *Populus* se demostró que la duración del área foliar se correlaciona negativamente con el nivel de daño ocasionado por roya (May De Mio *et al.*, 2006). En nuestro caso, el nivel de severidad de la enfermedad es del orden del 80 % para el clon Onda y del 20 % para el clon 'Australiano 106/60', explicando estos diferentes niveles de severidad por qué en el clon Onda los cambios son más notorios.

La roya no sólo adelanta la abscisión foliar en las plantas enfermas como indicamos anteriormente, sino que también, cuando las hojas abscinden con roya lo hacen con una concentración de N mucho mayor a la de las hojas que abscinden sin roya. Para ambos clones las hojas sin roya caen con una concentración de N entre el 0,65 - 0,75 % mientras que cuando las hojas tienen roya caen con una concentración 187 % y 100 % más alta para el clon Onda y clon 'Australiano 106/60' respectivamente (Figura 2). Para los mismos clones, pero en el Delta, la concentración de N de las hojas que abscindieron de plantas enfermas con roya fue un 50 % mayor a la de hojas libres de roya (Cortizo, 2014). Las diferencias en magnitud entre los ensayos son debidas a múltiples factores, uno de ellos podría ser los diferentes niveles de severidad de la enfermedad.

Esta mayor concentración de N en las hojas que abscindieron con roya se debe muy probablemente a que se produjo una retención de nutrientes por parte del hongo (en hifas, estructuras reproductivas y esporas). Los requerimientos nutricionales del hongo son mayores a los de una hoja, como lo demuestra la concentración de N en esporas de *Puccinia triticina* (roya del trigo) es del 3,5 % (Robert *et al.*, 2004). La presencia de masa fúngica en las hojas senescentes se demuestra en la concentración de glucosamina, que en hojas que abscinden con roya se encuentra entre 8 - 14  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de área foliar, mientras que cuando las hojas abscinden sin roya la concentración no sobrepasa los 2  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (Figura 3). Si bien no hubo diferencias entre los clones, las concentraciones más altas se encontraron en el clon Onda.

La caída anticipada de las hojas (figura 1) y con un mayor contenido de nitrógeno (figura 2) cuando las plantas tienen roya hace que disminuya la cantidad de nutrientes que son retranslocados a los tejidos de reserva, como las raíces y los tallos. Cuando las plantas crecen sin ningún factor importante de estrés, el contenido de nitrógeno en las hojas decrece a medida que la plantación se desarrolla, debido a que la biomasa foliar disminuye constantemente en comparación con la biomasa de tallos y raíces, y también disminuye la concentración de N en las hojas de árboles adultos (Graciano *et al.*, 2006). En *Populus tremuloides*, las hojas representan el 12 % de la biomasa y el 59 % del contenido de nitrógeno en plantas de 5 años, decreciendo a lo largo del tiempo, hasta que en plantas de 54 años representan el 2,2 % y 16 %, respectivamente (Wang *et al.*, 1995). Por otro lado, los requerimientos de N para el crecimiento en plantas de *Eucalyptus grandis* son cubiertos por la retranslocación desde las hojas senescentes en un 60 % en plantas de 3 años mientras que cuando las plantas tienen 14 años el aporte de las hojas senescentes desciende al 20 % (Graciano *et al.*, 2006). Por lo tanto, la presencia de la roya en los primeros años de una plantación tiene una fuerte repercusión sobre las tres primeras fases de la dinámica del N (Cooke & Weih, 2005). La roya, como toda enfermedad foliar, afecta al órgano que representa la mayor fuente de N retranslocable en la planta. Las hojas afectadas se vuelven un fuerte destino de N evitando que ese N sea dirigido a tejidos en crecimiento. Además, las hojas afectadas caen prematuramente y con un contenido mayor de N.

Con respecto a las raíces finas, la concentración de N sólo disminuyó en el clon Onda entre plantas sanas y enfermas en un 10 % (Figura 4). En las raíces gruesas también existió una disminución en la concentración de N sólo en el clon Onda, en este caso del 20 % (Figura 6). Una disminución en la concentración de N del 70 % se observó en raíces de plantas de estaquero de ambos clones (Cortizo, 2014), resultados bastante superiores a los encontrados



por nosotros, aunque en ese ensayo las concentraciones de N fueron al menos un 50 % mayores que las de nuestro ensayo.

La mayor disponibilidad de N en el suelo sólo produjo cambios en la concentración de N de las raíces gruesas en el clon 'Australiano 106/60', produciendo un aumento del 23 % en la concentración. Se han reportado aumentos de hasta un 200 % en la concentración de N de las raíces de *P. deltoides* en plantas fertilizadas (Li *et al.*, 2014). Por otro lado, la mayor concentración de N en las raíces gruesas en comparación con las raíces finas, 1,60 % N y 1,30 % N respectivamente, nos sugiere que las raíces gruesas cumplen un rol como órgano de reserva. La función de las raíces finas es principalmente la de absorber nutrientes, y tienen una vida media mucho más corta que la de las raíces gruesas. Existe un recambio anual en las raíces menores a 2 mm superior al 100 % mientras que cuando se considera raíces hasta 10 mm el recambio no llega al 10 % (Gill & Jackson, 2000).

En cuanto a los contenidos totales de N en raíces finas y gruesas, el contenido total de N fue notoriamente mayor en ambos clones cuando la disponibilidad de nitrógeno aumentó (Figura 5 y 7). Es importante remarcar, que como las concentraciones fueron similares con baja y alta disponibilidad de N (Figura 4 y 6) estos cambios en contenidos se deben a un aumento en la biomasa de raíces (Capítulo 2, Figura 9). Si bien no hubo diferencias significativas debido a la roya en el contenido de N de raíces finas, el contenido de N se reduce cuando las plantas que se encuentran con alta disponibilidad de N son afectadas por la roya. La caída es menor en el clon 'Australiano 106/60' (20 %) que en el clon Onda (40 %) (Figura 5). En cuanto al contenido de N en raíces gruesas, en el clon 'Australiano 106/60' la disminución en plantas enfermas es del 80 %, independientemente de la disponibilidad de N. En el clon Onda, la disminución es del 30 % cuando la disponibilidad de N es baja y casi del 90 % con alta disponibilidad de N (Figura 7). En cuanto a los tallos, en las plantas del clon Onda con baja disponibilidad de N se produjo una reducción mayor al 30% en la concentración de N en las plantas con roya, mientras que para el resto de los tratamientos no hubo diferencias de importancia (Figura 8). El efecto de la roya en los contenidos totales de N es muy fuerte. Los tratamientos con roya siempre tienen menor cantidad de N (Figura 9). Como es de esperar, al no haber diferencias en las concentraciones de N, la producción de biomasa aérea determina en gran medida la cantidad de N acumulado (Capítulo 2, Figura 10). La particularidad la tenemos en las plantas del clon Onda con baja disponibilidad de N, donde no hubo diferencias en la producción de biomasa aérea pero sí en la concentración de N, dando como resultado que la acumulación de N en tallo sea menor en las plantas enfermas. Estos resultados

demuestran que la roya reduce las reservas de N, porque reduce el crecimiento y en algunos casos porque se reduce la concentración con o sin cambios en el crecimiento.

La forma en que se acumula el nitrógeno hasta la próxima temporada de crecimiento es mediante proteínas de almacenaje vegetativas (VSP, por su sigla en inglés) (Rennenberg *et al.*, 2010). En *Populus sp.*, está demostrado que el 70 % del nitrógeno presente en los tallos en la temporada de reposo se encuentra en forma de VSP, que se concentran mayormente en células parenquimáticas de la corteza por lo que reciben el nombre de proteínas de almacenaje de la corteza (BSP, por sus siglas en inglés)(Cooke & Weih, 2005). De nuestros resultados se desprende que la concentración de proteínas en la corteza es menor en plantas enfermas, encontrándose las concentraciones en el rango de lo reportado para el género (Langheinrich & Tischner, 1991). La reducción es del 30 % en plantas del clon Onda fertilizadas y enfermas con respecto a las sanas (Figura 10). Esta reducción en la concentración de proteínas también se observa en el xilema, con una disminución de entre un 10 % y 30 %. Si bien encontramos proteínas tanto en el xilema secundario como en la corteza, la concentración de proteínas en la corteza es 20 veces mayor a la del xilema secundario, demostrando el carácter de la corteza también como tejido de reserva. Cuando se analiza separadamente la concentración de N en corteza y xilema secundario, el resultado es similar al obtenido midiendo proteínas, la concentración de N en corteza es del 1 % mientras que en el xilema secundario es del 0,2 % para plantas del clon 'Australiano 129/60' de entre 12 y 19 años (Ceballos, 2003).

La concentración de N en el tallo sólo varió entre las plantas sin roya y con roya del clon Onda con baja disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, la concentración de proteínas BST disminuyó en todos los casos cuando las plantas presentaban roya. Esto permite suponer que la presencia de la roya, si bien no tiene un efecto marcado sobre la concentración de N en el tallo (sólo hubo diferencias en el Onda con baja disponibilidad de N), cambia la forma en que el nitrógeno es almacenado. Posiblemente se reduzca la síntesis de proteínas BST, y éstas sean parcialmente remplazadas por otras formas de almacenamiento de nitrógeno menos costosas en términos de biosíntesis, tales como aminoácidos , por ejemplo arginina, glutamina y asparagina (Rennenberg *et al.*, 2010). Estos resultados, indicarían también que la enfermedad tiene alto impacto en las reservas de carbono, tal como lo refleja que en algunos tratamientos hay marcada disminución de la materia seca, sin cambios o incluso con un leve aumento en la concentración de N (clon 'Australiano 106/60' con alta disponibilidad de N).

El almacenaje interno de nitrógeno durante los meses de reposo, permite que los procesos de desarrollo durante la primavera siguiente se vuelvan marcadamente independientes de las condiciones ambientales, principalmente de las temperaturas del suelo, siendo ésta una característica ecológica importante ante condiciones adversas (Rennenberg *et al.*, 2010). En nuestro caso, en un balance general, el contenido total de N acumulado en la biomasa disminuye considerablemente cuando las plantas presentan roya, existiendo una reducción del N almacenado que como mínimo es del 30 % y puede llegar a ser superior al 70 % (Tabla 1). En manzanos (*Malus domestica*) está demostrado que el nitrógeno removilizado hacia los nuevos órganos en la primavera está relacionado positiva y linealmente con el contenido de nitrógeno en los órganos de reserva resultado de la temporada de crecimiento anterior. Por otra parte, al aumentar el contenido de nitrógeno, almacenado disminuye el aporte por parte de las raíces en la primavera siguiente (Cheng & Fuchigami, 2002). En estaqueros de *Populus deltoides* se determinó que en las plantas que habían tenido roya en la temporada anterior, el rebrote fue menor (por ejemplo, disminuyó el número de hojas y el tamaño de las guías) al compararlo con plantas que habían crecido sin roya (Cortizo, 2014). Por lo tanto, si bien el rebrote en la temporada siguiente no ha sido medido en esta tesis, es de esperar que en la temporada siguiente, la disminución en el almacenamiento de N cuando las plantas han tenido roya, tendrá una influencia negativa sobre la capacidad de brotación.

#### **4.6- Conclusiones.**

La presencia de roya hace que las hojas de ambos clones abscindan prematuramente y con una concentración de nitrógeno mayor, el cual es probablemente retenido por la masa fúngica.

En el clon Onda, la presencia de roya produce una reducción en la concentración de N de las raíces finas, raíces gruesas y del tallo (sólo en las plantas con baja disponibilidad de N). Como consecuencia el contenido de N acumulado en la planta se reduce, tanto en la parte aérea como subterránea.

En el clon 'Australiano 106/60', si bien no hubo cambios en las concentraciones de N para ninguno de los compartimentos debido a la presencia de la roya, se produce una reducción en el contenido de N acumulado en la planta, porque la enfermedad reduce el crecimiento tanto del tallo como de las raíces.

La concentración de proteínas en el xilema secundario y en la corteza es menor en las plantas con roya en ambos clones.

Si las plantas de ambos clones crecen con mayor disponibilidad de N, el N contenido en los tejidos de reserva aumenta. Sin embargo, la roya produce una disminución en el contenido de este nutriente similar, bajo las diferentes disponibilidades de N.

## **Capítulo 5: Interacción entre estrés hídrico y roya.**

## 5.1- Introducción.

Las plantas del género *Populus* sp. crecen a tasas relativamente altas comparadas con otros géneros utilizados en plantaciones forestales. Esta productividad está estrechamente relacionada con la disponibilidad de agua y el grado de tolerancia de los clones al estrés hídrico (Marron *et al.*, 2003).

En las plantaciones de álamos del Delta del Paraná las plantas pueden estar expuestas a estrés hídrico por exceso de agua (inundación) o por falta de agua (sequía) (Luquez *et al.*, 2012) como así también en el resto de las zonas de producción en el país. Las respuestas de las plantas a la inundación varían de acuerdo a la duración del período de estrés, el grado de cobertura por el agua y si la inundación ocurre durante el período de crecimiento o de reposo (Kozlowsky, 1997). En plantas de *Populus* sp. sometidas a inundación se produce una rápida disminución en la actividad fotosintética, la conductancia estomática (gs), el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) y el contenido de clorofilas. Como consecuencia, cuando el estrés es prolongado, se observa una disminución en el crecimiento y área foliar, aumento en la relación tallo/raíz, defoliación anticipada e incluso muerte de las plantas. Estas consecuencias de la inundación son más notorias en los clones menos tolerantes (Bejaoui *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2005; Luquez *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2013; Vreugdenhil *et al.*, 2006).

Cuando las plantas del género *Populus* sp. se encuentran bajo situaciones de estrés por sequía, rápidamente se produce una disminución de la actividad fotosintética y la conductancia estomática. Esto da como resultado una menor biomasa total, disminución del área foliar y del área foliar específica, pérdida de hojas o incluso defoliación total, disminución en la relación tallo/raíz y aumento en la eficiencia de uso del agua (Marron *et al.*, 2003; Monclus *et al.*, 2006; Tschaplinski *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

Las condiciones de humedad ambiental, además de afectar a las plantas, también pueden modificar el desarrollo de las enfermedades fúngicas foliares. Por lo general, los hongos patógenos suelen tener mayor desarrollo y ocasionar mayores daños en ambientes húmedos. Está demostrado que el grado de infección por roya es altamente dependiente de las condiciones climáticas durante la estación de crecimiento (Das *et al.*, 2007; Dowkiw *et al.*,

2003; Robert *et al.*, 2002). En este sentido, se observó mayor infección por *Melampsora medusae* en plantas de *Populus deltoides* irrigadas que en las no irrigadas (Coyle *et al.*, 2006).

Como la roya afecta los mismos mecanismos fisiológicos que son alterados por el exceso y el déficit de agua, pero la sequía y la inundación a su vez pueden afectar el desarrollo de la enfermedad, es importante evaluar los efectos conjuntos de la ocurrencia de estrés hídrico y roya. Los efectos de los dos estreses combinados pueden ser sinérgicos, aditivos o antagónicos (Bansal *et al.*, 2013). Esto significa que el impacto de la enfermedad foliar puede ser mayor, igual o menor en caso de que la planta esté creciendo bajo estrés por sequía o inundación. Sin embargo, es poca la información disponible sobre cuánto afecta al crecimiento de los álamos, la interacción entre el estrés hídrico por falta o exceso de agua y el daño por roya, factores que suelen darse en simultáneo en los sistemas productivos.

Si la disponibilidad de agua para la planta afecta el nivel de severidad de la enfermedad, es difícil evaluar experimentalmente niveles de roya similares en plantas que están creciendo bajo sequía, capacidad de campo o inundación. Dado que la defoliación es uno de los efectos principales de la roya, una manera de simular un nivel de ataque similar en plantas que están creciendo en diferentes condiciones hídricas es realizar una defoliación similar en todos los tratamientos. Con esta aproximación experimental se podrá inferir si niveles de defoliación similares afectarán el crecimiento en igual magnitud en plantas expuestas a estrés hídrico. Posiblemente la defoliación en plantas que crecen a capacidad de campo reducirá más el crecimiento que la defoliación en plantas bajo estrés hídrico porque se removerán hojas con alta actividad fisiológica que están sosteniendo una alta tasa de crecimiento. Por el contrario, las hojas de las plantas estresadas posiblemente ya iniciaron el proceso de senescencia con la consecuente disminución en la actividad metabólica y removilización de nutrientes hacia otros tejidos (Keskitalo *et al.*, 2005).

## **5.2- Objetivos e hipótesis.**

Objetivo 4.1: Evaluar la magnitud de la reducción en el crecimiento y acumulación de nutrientes debidos a la defoliación, de dos clones de álamo, en interacción con la disponibilidad hídrica.

Hipótesis 4.1: La disminución en el crecimiento y en la acumulación de nutrientes por efecto de la defoliación es mayor en plantas con buena disponibilidad hídrica.

Objetivo 4.2: Analizar a nivel foliar la interacción entre estrés hídrico (por inundación y por sequía) y grado de infección por roya.

Hipótesis 4.2: El grado de infección por roya es mayor en condiciones de buena disponibilidad hídrica. En consecuencia, el daño y la caída de hojas serán más marcados en plantas a capacidad de campo.



### 5.3- Materiales y métodos.

#### 5.3.1- Ensayo 3 (temporada 2011-2012).

En la temporada 2011-2012 se estableció un ensayo en las instalaciones del INFIVE. Se utilizó el clon Onda, susceptible a roya y medianamente tolerante a la inundación. Se utilizaron 36 estacas de 50 cm de largo que, a finales de agosto del 2011, se plantaron en contenedores de 100 litros rellenos con una mezcla de arena y tierra (relación 10 a 1), a razón de una estaca por contenedor. Las plantas crecieron en condiciones de buena disponibilidad de agua hasta la primera semana de enero de 2012, donde se aplicaron tres diferentes condiciones hídricas. Un grupo de plantas se dejó en las mismas condiciones en las que venían creciendo, es decir, a capacidad de campo, recibiendo tres riegos semanales (CC). A otro grupo de plantas se le restringió el riego a 1/3 del volumen aplicado cada día a las plantas CC y con frecuencia de uno semanal (1/3 de frecuencia), tratamiento con estrés por sequía (S). Al último grupo de plantas se las inundó, reponiendo el agua para mantener un nivel de 5 cm de agua sobre el suelo (I). Estos tratamientos se mantuvieron hasta finalizar el ensayo, luego de la abscisión otoñal. Para caracterizar los tratamientos hídricos se colocaron 4 sensores de humedad en los tratamientos a capacidad de campo y sequía, y se comprobó que en el suelo del tratamiento sequía el contenido de humedad se encontraba en el 50 % del contenido de humedad del suelo a capacidad de campo.

Desde el comienzo del ensayo, se mantuvo a la mitad de las plantas libres de roya mediante la pulverización quincenal con tebuconazole (como se detalla en el capítulo 2), quedando el resto de las plantas expuestas a la infección natural por roya. Sin embargo, el verano de la temporada 2011-2012 fue particularmente cálido y seco, por lo que a mediados de marzo de 2012 y como no se observaba evidencia de la presencia de la enfermedad, se procedió a realizar una defoliación del 50% del número de hojas simulando un ataque de roya severo (Cortizo *et al.*, 2006). Por lo tanto, el ensayo consistió en 6 tratamientos con 6 plantas por tratamientos: plantas a capacidad de campo defoliadas (CC D+), plantas a capacidad de campo sin defoliar (CC D-), plantas con sequía defoliadas (S D+), plantas con sequía sin defoliar (S D-), plantas inundadas defoliadas (I D+) y plantas inundadas sin defoliar (I D-).

Previo al tratamiento de defoliación se realizaron mediciones de fotosíntesis neta, conductancia estomática y concentración de clorofilas mediante Spad (siguiendo las mismas metodologías explicadas en el capítulo 3). Con las hojas procedentes de la implementación del tratamiento de defoliación se estimó el área foliar para cada uno de los tratamientos hídricos. Para ello, se procedió a pesar el total de las hojas extraídas. Luego se tomó una sub-muestra de 10 hojas a las cuales se les tomó una fotografía, midió el área foliar (con la ayuda del programa ImageTool) y se pesaron. Posteriormente, con la relación que se estableció entre el área foliar y el peso de la sub-muestra se estimó el área foliar del resto de las hojas en función del peso. Al extraer el 50 % de las hojas se asumió que representaban el 50 % del área foliar. También, muestras de esas hojas verdes se colocaron en estufa a 60 °C hasta peso contante y se almacenaron para la determinación de nutrientes en hoja verde (N y P). Posteriormente, a medida el resto de las hojas fueron cayendo de forma natural, se recolectaron (al menos 10 hojas por tratamiento), se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante y también se almacenaron para la determinación de nutrientes en hojas senescentes (N y P). La determinación de N se realizó de la misma forma que se describe en el capítulo 4. La determinación de P mediante una digestión ácida y la posterior lectura por espectrometría de emisión de plasma inducido. Nuevamente, estas determinaciones fueron realizadas por el LANAIS N-15, CONICET-UNS (Agronomía), 8000 Bahía Blanca, Argentina.

Una vez que las plantas perdieron la totalidad de las hojas se midió altura y diámetro a la altura del cuello (DAC). Se cortó la parte aérea y luego se procedió a la extracción de las raíces. Para limpiar las raíces se pasó todo el contenido de los contenedores (suelo más raíces) por una zaranda para separar manualmente las raíces, y posteriormente se lavaron con abundante agua. Tanto la parte aérea como las raíces obtenidas se colocaron en estufa hasta peso constante y luego se pesaron para determinar la acumulación de biomasa total, biomasa aérea (tallo y estaca) y biomasa subterránea (raíces finas <5mm, raíces gruesas ≤5mm y raíces inducidas por la inundación). Se tomó una muestra de tallo (los primeros de 10 cm), raíces finas y raíces gruesas de cada planta para la determinación de nutrientes (N y P), como se explica en el párrafo anterior.

### 5.3.2- Ensayo 4 (temporada 2013-2014).

Este ensayo se realizó también en el INFIVE y consistió en un ensayo muy similar al ensayo 3 (tamaño de las estacas, tamaño de los contenedores, sustrato). Se utilizaron los

clones Onda y 'Australiano 106/60'. Se mantuvieron las tres condiciones hídricas (capacidad de campo, inundación y sequía) y el momento de aplicación de los mismos que en el ensayo 3, y dos condiciones de roya (libres de roya y con roya). Se asignaron 6 plantas por tratamiento. A diferencia del ensayo anterior no se realizó la defoliación del 50 % ya que los primeros signos de la enfermedad se registraron a partir del 10 de febrero de 2014. La evolución de la enfermedad se estimó registrando periódicamente la incidencia y la severidad. La incidencia fue definida como el número de hojas con síntomas de la enfermedad sobre el número total de hojas de cada planta y a la severidad como el área afectada por la enfermedad en cada hoja. Luego, se estimó el grado de severidad de cada planta mediante el promedio de la severidad de cada una de las hojas que componen la planta.

Desde los 150 días desde el equinoccio de primavera hasta que las plantas se encontraron totalmente defoliadas se registró el número total de hojas por planta regularmente.

Por un lapso de 30 días (desde el día 185 hasta el 215 desde el equinoccio de primavera) se marcaron hojas y se midió el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm, como se detalla en el capítulo 3) sobre las mismas hojas para poder estimar una evolución del daño a medida que pasaba el tiempo.

En resumen, el ensayo consistió en 12 tratamientos con 6 plantas por tratamiento: plantas a capacidad de campo sin roya (CC R-), plantas a capacidad de campo con roya (CC R+), plantas con sequía sin roya (S R-), plantas con sequía con roya (S R+), plantas inundadas sin roya (I R-) y plantas inundadas con roya (I R+), tanto para el clon Onda (O) como para el clon 'Australiano 106/60'.

### 5.3.3- Análisis estadístico y presentación.

Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Duncan, ambos con una significancia del 95%. En el ensayo 3 los factores fueron defoliación (D) y tratamiento hídrico (TH). En el ensayo 4 los factores considerados fueron roya (R) y tratamiento hídrico (TH), para cada clon por separado. En todos los casos se analizaron las interacciones entre los factores.

Para la realización de las figuras se tomaron las medias provenientes de los ANOVA realizados con sus respectivos errores estándar. Además, los valores de p derivados del ANOVA

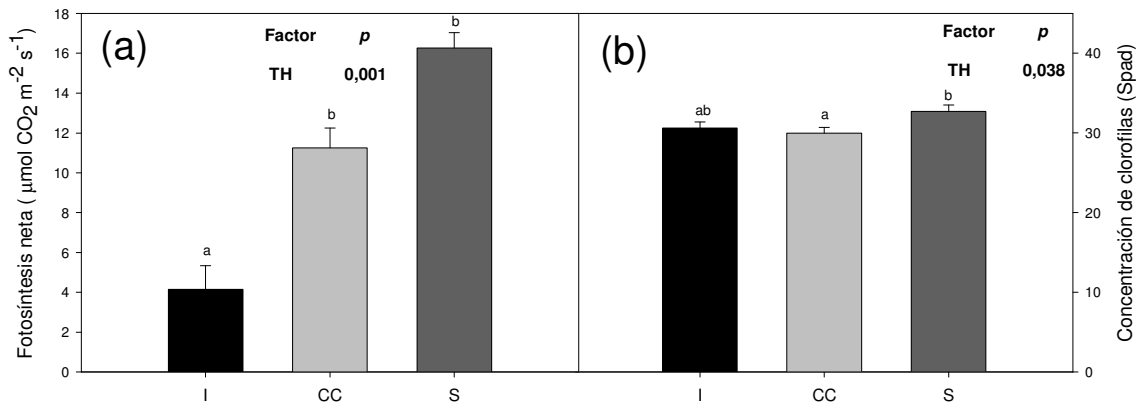
se muestran en cada figura resaltándose en negrita el factor o los factores estadísticamente significativos. Cuando fue necesario, se agregó a la figura el/los test de Duncan.

## 5.4- Resultados.

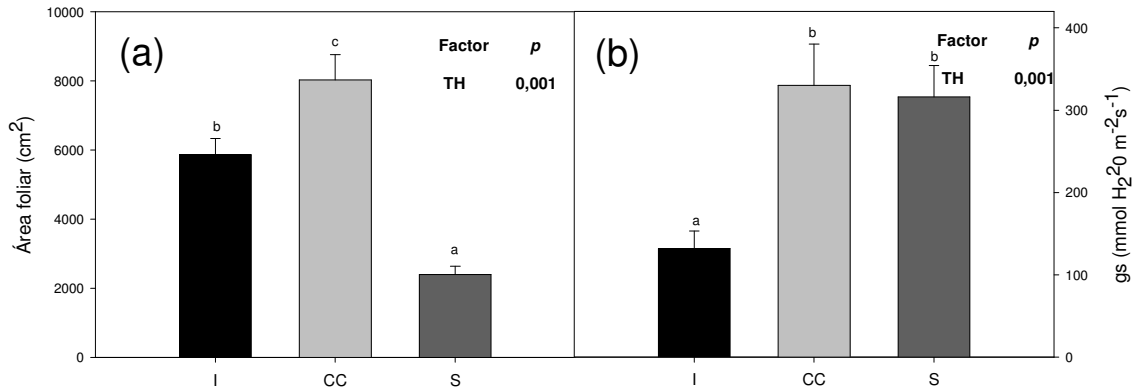
### 5.4.1- Ensayo 3: Caracterización de los tratamientos hídricos.

Con las mediciones realizadas previo a la defoliación del 50% fue posible describir los tratamientos hídricos a los que se sometieron las plantas. Hubo un efecto del estado hídrico del suelo sobre la fotosíntesis neta. La fotosíntesis neta fue similar para las plantas a CC y S respectivamente, mientras que en las plantas inundadas disminuyó marcadamente (Figura 1a). Hubo un pequeño aumento en la concentración de clorofilas (Spad) en las plantas S con respecto a la plantas en CC, mientras que las plantas I no se diferenciaron del tratamiento CC ni del S (Figura 1b).

El área foliar por planta disminuyó con respecto al tratamiento CC por ambos estreses hídricos, pero la reducción fue mayor en el tratamiento S que en el tratamiento I (Figura 2a). Los cambios también fueron apreciables en la conductancia estomática (gs), donde hubo una reducción muy fuerte en el tratamiento I con respecto a CC, pero no se modificó en el tratamiento S (Figura 2b).



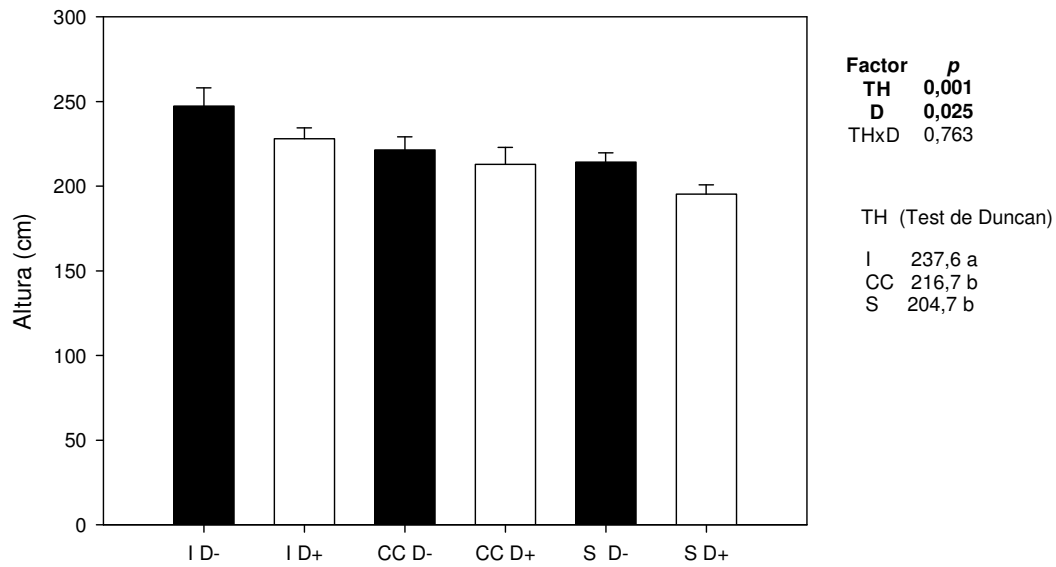
**Figura 1:** Fotosíntesis neta (a) y contenido de clorofilas (b) en el clon Onda en el ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Dentro de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).



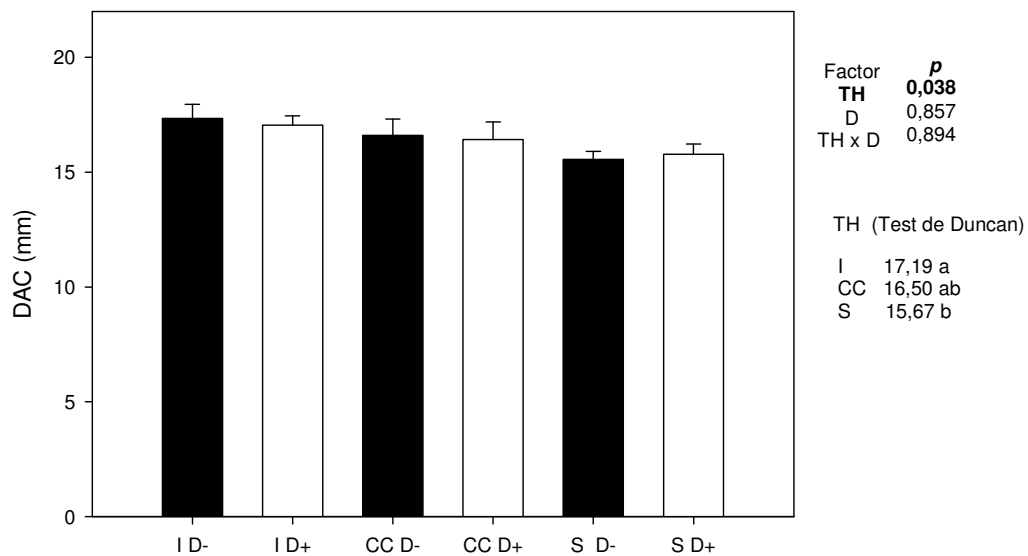
**Figura 2:** Área foliar (a) y conductancia estomática (gs) (b) en el ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Dentro de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2- Ensayo 3: Cambios en el crecimiento debido a la interacción entre defoliación y estrés hídrico.

La altura de las plantas fue modificada por la defoliación y por el estrés hídrico. La defoliación produjo una reducción en la altura de entre el 5 - 10 % al comparar las plantas defoliadas y no defoliadas dentro de cada tratamiento hídrico. Las plantas del tratamiento I presentaron una altura mayor a la de los tratamientos CC y S (Figura 3). El DAC sólo fue modificado por el tratamiento hídrico. El DAC fue mayor en las plantas del tratamiento I, intermedio en CC, y menor en el tratamiento S (Figura 4).



**Figura 3:** Altura (cm) de las plantas del clon Onda para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

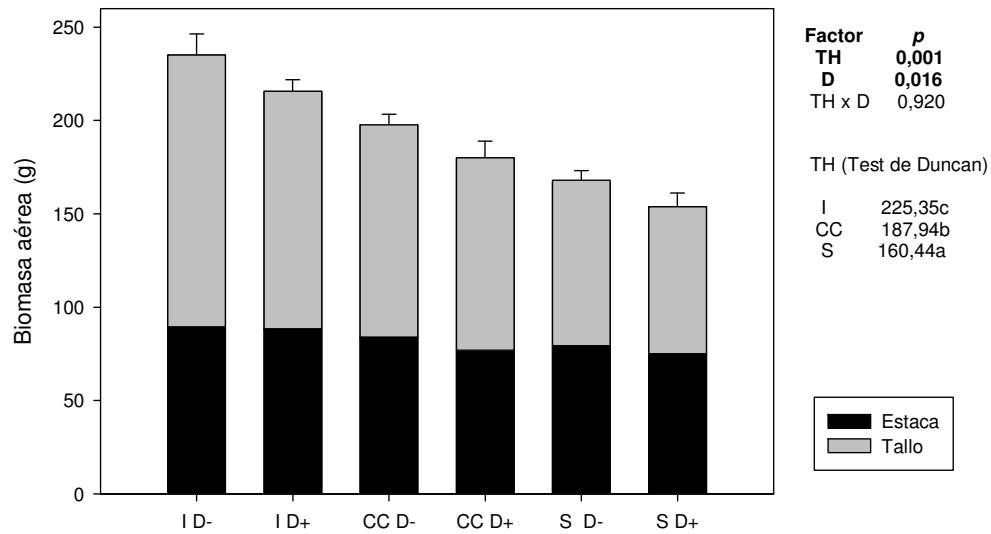


**Figura 4:** Diámetro del cuello (DAC) (mm) de las plantas del clon Onda para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho se observa los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

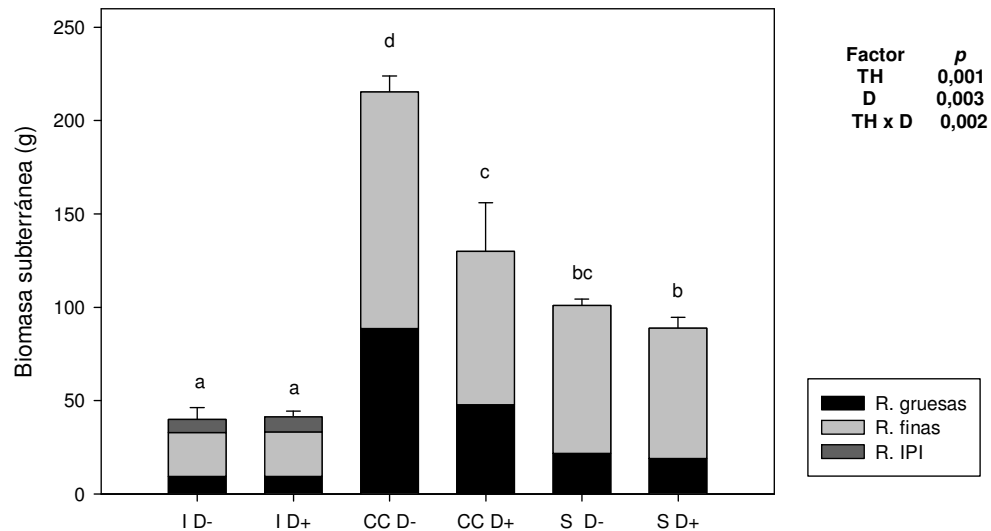
La acumulación de biomasa aérea (tallos y estaca) fue modificada por la defoliación y por el estrés hídrico. Hubo una disminución aproximada del 9 % al comparar las plantas no defoliadas y defoliadas de cada tratamiento hídrico. Las plantas del tratamiento CC acumularon más biomasa aérea que las plantas del tratamiento S pero menos que el tratamiento I. Los cambios en la acumulación de biomasa debido al estrés hídrico se produjeron tanto en la estaca como en las guías producidas ese año (tallos), mientras que los debidos a la defoliación sólo se registraron en los tallos (Figura 5).

En la acumulación de biomasa subterránea, sin embargo, hubo una interacción entre la defoliación y el estrés hídrico. La mayor acumulación de biomasa subterránea se encontró en las plantas no defoliadas del tratamiento CC, evidenciándose una fuerte reducción cuando las plantas del tratamiento CC fueron defoliadas. Sin embargo, la biomasa subterránea en los tratamientos S e I fue inferior al tratamiento CC, y sin diferencias entre plantas D+ y D-. Por último, las plantas del tratamiento I presentaron los valores más bajos de acumulación de biomasa subterránea. En este tratamiento hídrico la acumulación de biomasa subterránea presentó raíces finas inducidas por la inundación que corresponden al 20% del peso de raíces. La interacción entre la defoliación y el estrés hídrico se mantiene si se analizan por separado las raíces finas y gruesas (Figura 6).





**Figura 5:** Acumulación de biomasa aérea (g) de las plantas del clon Onda para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Se diferencia la estaca y el tallo producido ese año (guías). Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).



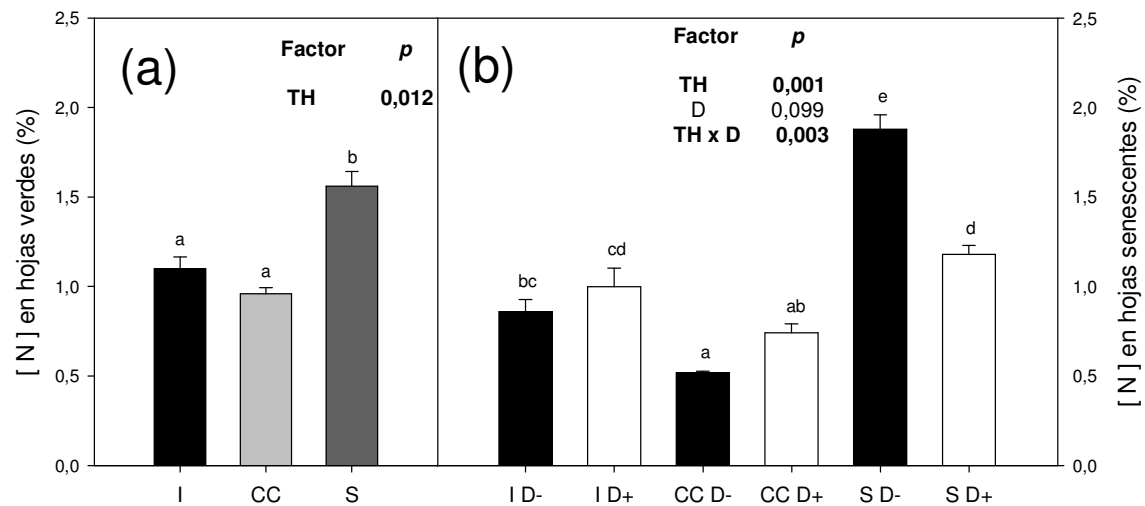
**Figura 6:** Acumulación de biomasa subterránea (g) de las plantas del clon Onda para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC), sequía (S), raíces gruesas (R. gruesas), raíces finas (R. finas) y raíces inducidas por la inundación (R. IPI). Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores

estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

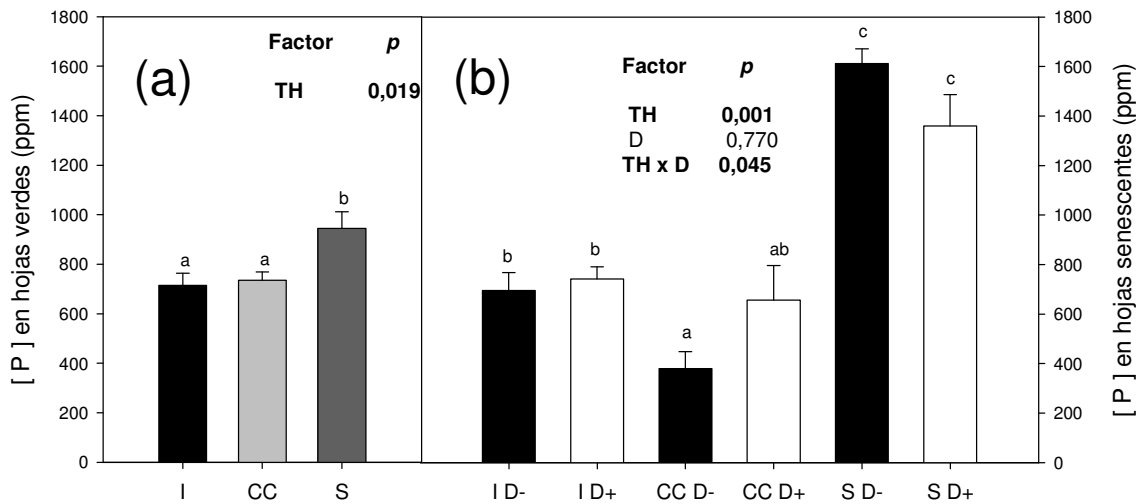
#### 5.4.3- Ensayo 3: Cambios en la dinámica de los nutrientes debido a la interacción entre la defoliación y el estrés hídrico.

La concentración de N en hojas verdes, previo a la defoliación, varió en respuesta a los tratamientos hídricos. La concentración de N fue similar en las plantas I y las plantas CC, mientras que aumentó en las plantas S (Figura 7a). Cuando se produjo la abscisión de las hojas hubo interacción entre el tratamiento hídrico y la defoliación. Las hojas de plantas D- y D+ de los tratamientos CC e I cayeron con una concentración de N similar. Las hojas del tratamiento S D- cayeron con una mayor concentración de N que las S D+ (Figura 7b).

La concentración de P presentó un comportamiento similar al de la concentración de N, tanto en hojas verdes como en las que presentaron abscisión natural. En las hojas verdes no hubo diferencias entre los tratamientos CC e I, mientras que en el tratamiento S la concentración de P fue mayor (Figura 8a). En cuanto a las hojas al caer, las concentraciones fueron similares en plantas D+ y D- en los tres tratamientos hídricos, y mayor en S que en CC e I (Figura 8b).

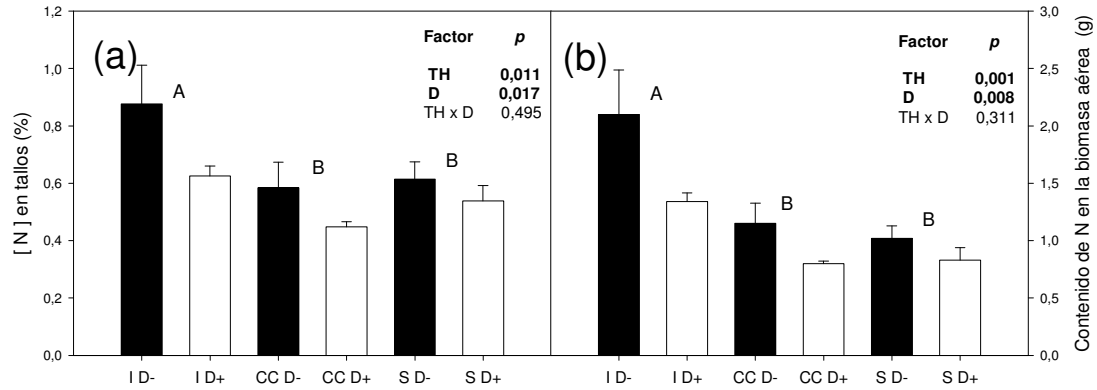


**Figura 7:** Concentración de N en hojas verdes en verano (a) y senescentes en otoño (b) en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

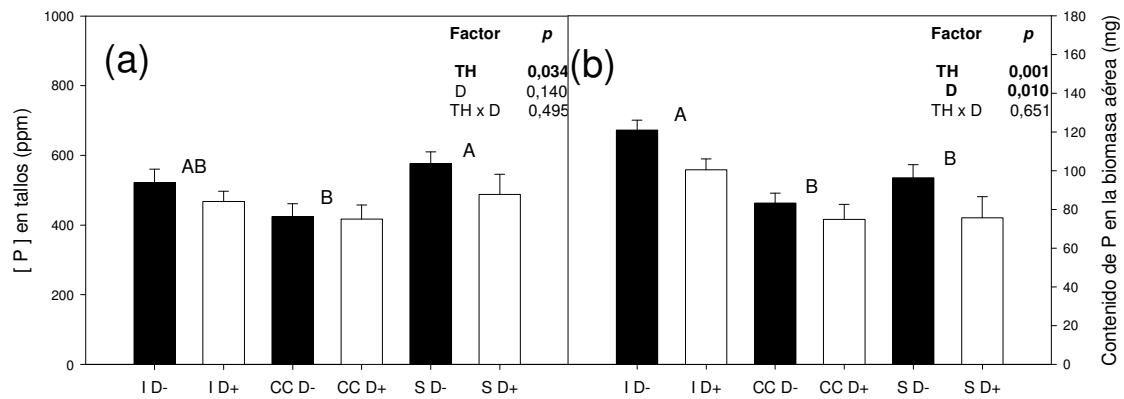


**Figura 8:** Concentración de P en hojas verdes (a) y senescentes (b) en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

La concentración y el contenido (i.e., concentración x masa) de N en tallos fueron modificados tanto por el tratamiento hídrico como por la defoliación, pero no hubo interacción. La concentración y el contenido de N fueron similares en los tratamientos CC y S, aumentando considerablemente en el tratamiento I. Los tratamientos D+ presentaron concentraciones y contenidos más bajos que los tratamientos D- (Figura 9a y 9b). En cambio, la concentración de P en tallos sólo varió en función del tratamiento hídrico mientras que el contenido de P en la parte aérea fue modificado tanto por el tratamiento hídrico como por la defoliación, no existiendo interacción. La concentración de P en el tratamiento CC fue menor que en el tratamiento S, mientras que el tratamiento I presentó un valor intermedio (Figura 10a). El contenido de P fue similar en los tratamientos CC y S, pero menor al del tratamiento I. En cuanto al efecto de la defoliación, las plantas defoliadas presentaron un contenido de P en la biomasa aérea menor a las plantas no defoliadas (Figura 10b).



**Figura 9:** Concentración de N en tallos (a) y contenido de N en la biomasa aérea (b) en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

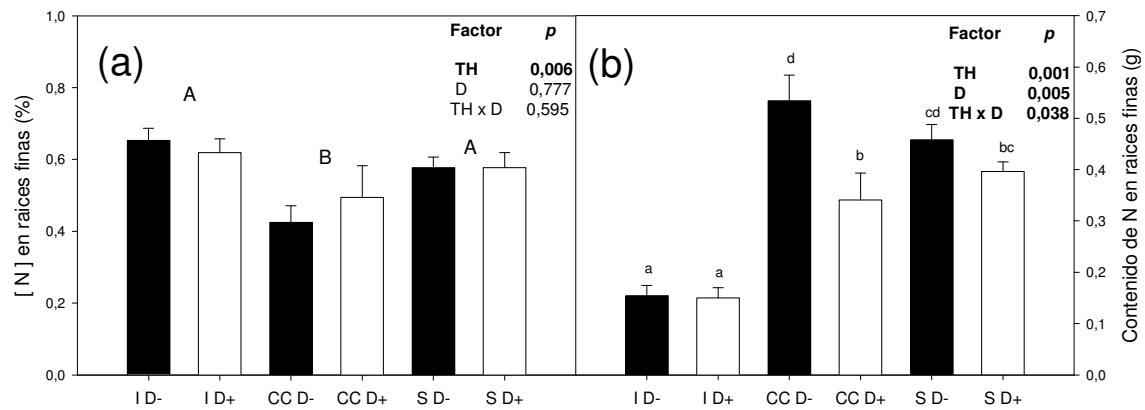


**Figura 10:** Concentración de P en tallos (a) y contenido de P en la biomasa aérea (b) en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

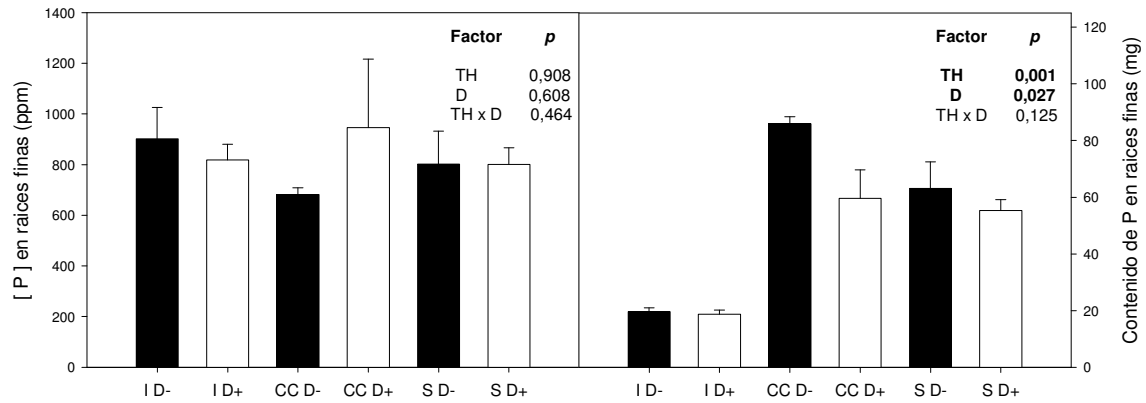
La concentración de N en las raíces finas sólo fue modificada por el tratamiento hídrico. Las plantas de tratamiento CC presentaron una concentración de N significativamente menor a la de los tratamientos S e I (Figura 11a). En cambio, en el contenido de N en raíces finas existió interacción entre la defoliación y el tratamiento hídrico. Las plantas del

tratamiento CC D- tuvieron el mayor contenido de N, mientras que el contenido de N en las plantas CC D+ fue menor. El contenido de N de las plantas S fue similar en D- y D+. Las plantas de los tratamientos I D- e I D+ presentaron los contenidos más bajos de N (Figura 11b).

La concentración de P en las raíces finas no fue modificada ni por la defoliación ni por el tratamiento hídrico (Figura 12a). En cambio, el contenido (i.e., concentración x masa) de P de las raíces finas fue modificado por la defoliación y el tratamiento hídrico. El contenido de P en las raíces finas del tratamiento I fue muy inferior a los contenidos en los tratamientos S y CC. La defoliación sólo causó una reducción en el contenido de P en los tratamientos CC y S (Figura 12b).

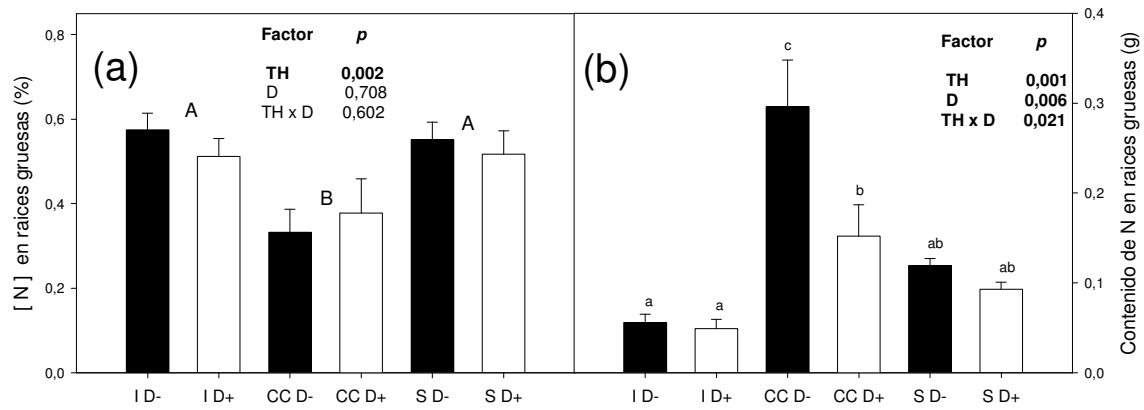


**Figura 11:** Concentración (a) y contenido (b) de N en raíces finas en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

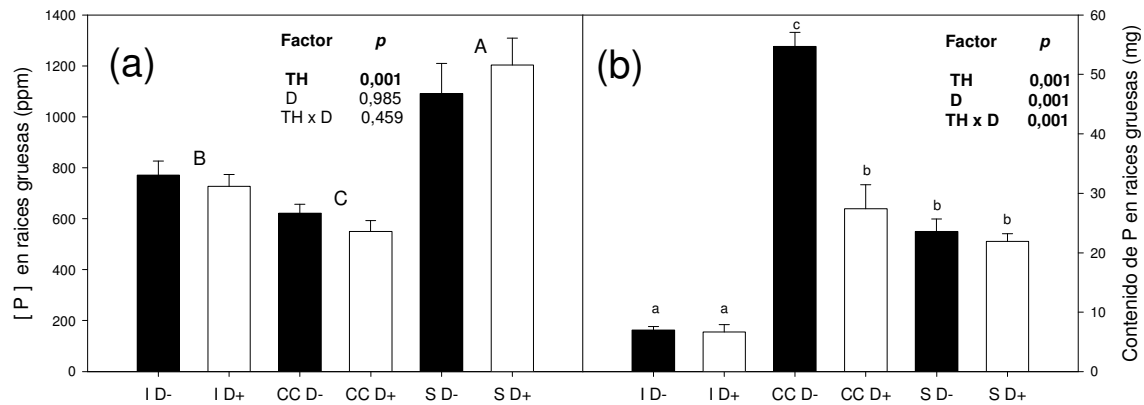


**Figura 12:** Concentración (a) y contenido (b) de P en raíces finas en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Las concentraciones de N y P en raíces gruesas sólo fueron modificadas por el tratamiento hídrico. La concentración de N y P en las plantas de los tratamientos CC fue menor a los tratamientos I y S (Figura 13a). Hubo interacción entre la defoliación y los tratamientos hídricos en los contenidos de N y P. El contenido de N de las plantas CC D- fue un 50 % mayor al de las plantas CC D+. Los contenidos más bajos de N los presentaron las plantas I D- e I D+. En cambio, los tratamientos S D- y S D+ tuvieron contenidos intermedios (Figura 13b). El contenido de P presenta un comportamiento similar al contenido de N. Las plantas del tratamiento CC D- tuvieron el mayor contenido de P y se observó una reducción en el contenido de P del 50 % en las plantas del tratamiento CC D+. Las plantas de los tratamientos S D- y S D+ tuvieron un contenido de P similar entre sí. Los contenidos de P más bajos se encontraron en los tratamientos I D- e I D+ (Figura 14b).



**Figura 13:** Concentración (a) y contenido (b) de N en raíces gruesas en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Concentración (a) y contenido (b) de P en raíces gruesas en el clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 con sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). Sobre el margen superior derecho de cada gráfico se observan los valores de p derivados del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Diferentes letras significan diferencias significativas entre los tratamientos (test de Duncan,  $p < 0,05$ ).

El contenido de N total acumulado fue mayor en las plantas inundadas que en las plantas a capacidad de campo y sequía ( $p = 0,006$ ). Las plantas defoliadas acumularon menor cantidad de N en todos los tratamientos hídricos ( $p = 0,003$ ). El contenido de P total acumulado fue menor en las plantas defoliadas que en las no defoliadas para todos los tratamientos ( $p > 0,001$ ) (Tabla 1).

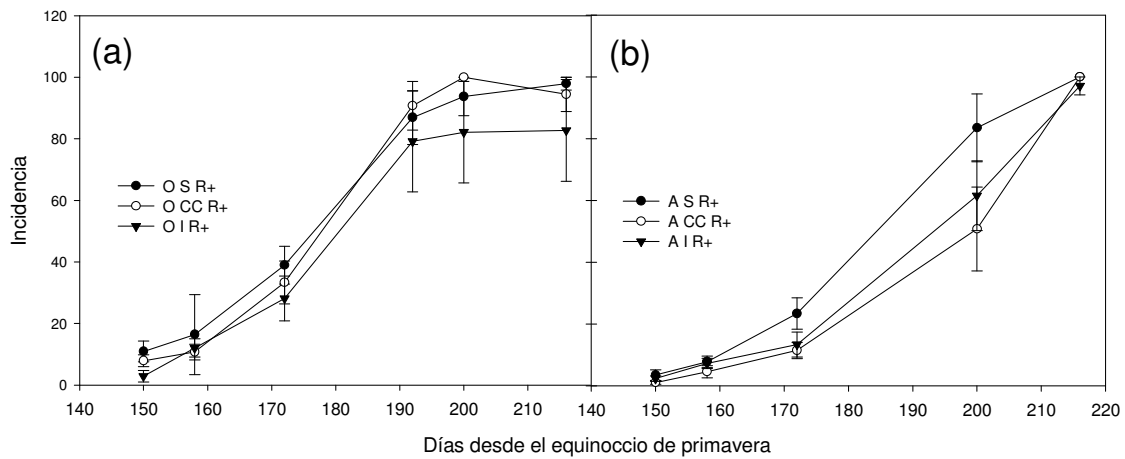
**Tabla 1:** Contenidos totales de N (g) y P (mg) por planta del clon Onda para los diferentes tratamientos del ensayo 3 y sus respectivos errores estándar. Defoliadas (D+), sin defoliar (D-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S).

Tratamiento	N (g)	P (mg)
I D-	2,22+0,4	128,7+4,6
I D+	1,44+0,1	107,8+6,3
CC D-	1,69+0,2	142,4+7,0
CC D+	1,05+0,1	104,1+6,6
S D-	1,26+0,1	122,1+6,4
S D+	0,99+0,1	99,2+12,2
I	1,83+0,22 a	118,2+4,8 a
CC	1,34+0,15 b	121,5+7,5 a
S	1,13+0,09 b	110,6+7,4 a
D-	1,72++0,18 a	130,4+3,8 a
D+	1,17+0,06 b	103,7+4,8 b

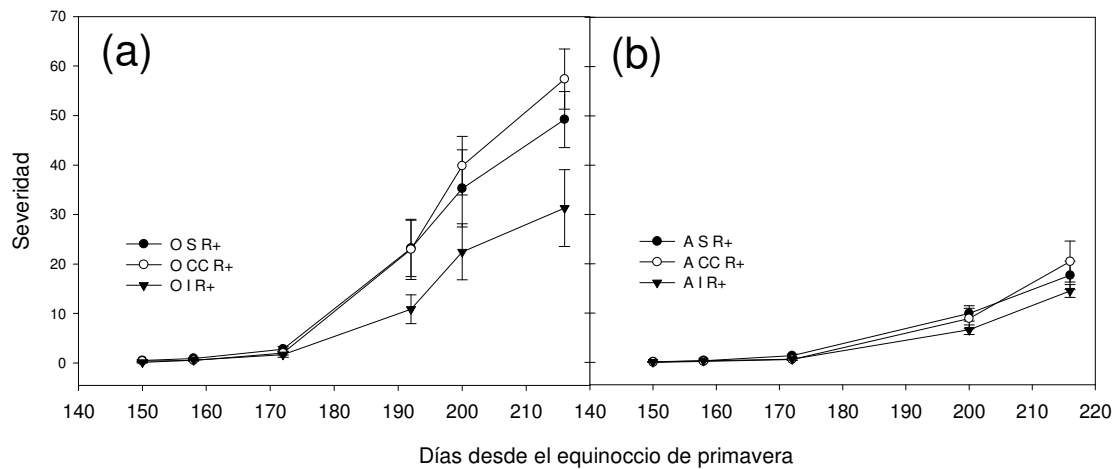
#### 5.4.4-Ensayo 4. Interacción entre roya y estrés hídrico. Evolución de la roya y cambios asociados a nivel foliar.

El nivel de incidencia de la enfermedad no fue modificado por las condiciones hídricas ensayadas, alcanzando una incidencia cercana al 100 % en ambos clones. Sin embargo, en el clon 'Australiano 106/60' este nivel de incidencia se alcanzó más tardíamente que en el clon Onda (Figura 15a y 15b). En cuanto a la severidad de la enfermedad, en el clon 'Australiano 106/60' no sobrepasó el 20 % para ninguno de los tratamientos hídricos, sin diferencias entre los tratamientos. En cambio, en el clon Onda la severidad alcanzó valores del 30 % en las plantas del tratamiento I, mientras que en los tratamientos S y CC llegó a valores del 50 % y 60 %, respectivamente (Figura 16a y 16b).





**Figura 15:** Incidencia de la roya (% de hojas afectadas por planta) a lo largo del tiempo en el ensayo 4 para el clon Onda (a) y el clon 'Australiano 106/60' (b) con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), plantas con roya (R+), plantas sin roya (R-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). En el eje de las ordenas se representan días desde el equinoccio de primavera.



**Figura 16:** Severidad de la roya (% del aérea foliar afectada por planta) a lo largo del tiempo en el ensayo 4 para el clon Onda (a) y el clon 'Australiano 106/60' (b) con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), plantas con roya (R+), plantas sin roya (R-), inundación (I), capacidad de campo (CC) y sequía (S). En el eje de las ordenas se representan días desde el equinoccio de primavera.

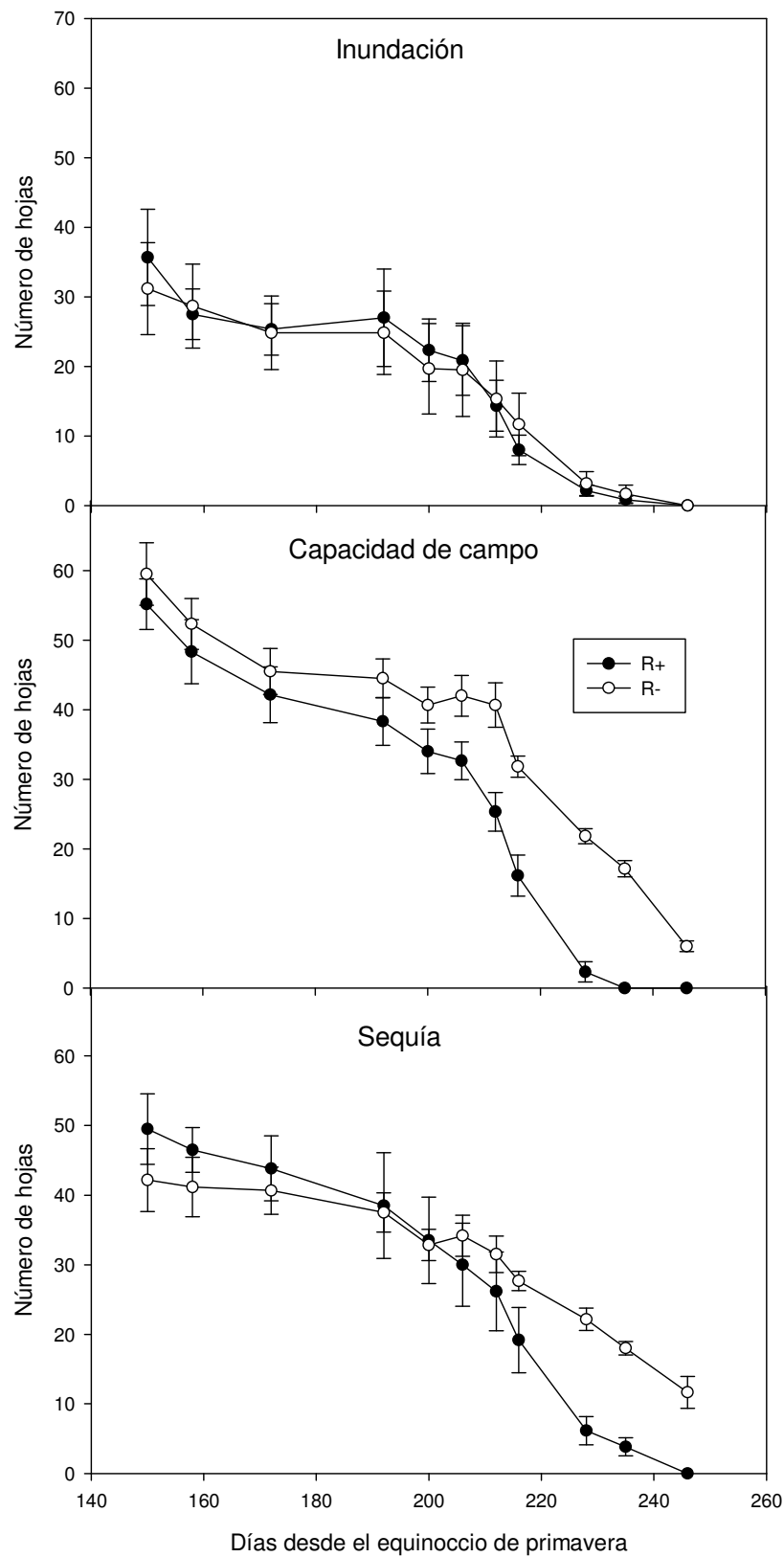
En el ensayo 4, para el clon Onda, el número de hojas por planta estuvo fuertemente influenciado por el tratamiento hídrico al comienzo de las mediciones. En el tratamiento CC el número de hojas fue del orden de las 60 por planta cuando aparecieron los primeros síntomas

de la roya, sin diferencias entre las plantas R- y R+. El número de hojas por planta disminuyó constantemente hasta que las plantas quedaron sin hojas, siendo esta caída más marcada en las plantas R+ (las diferencias se hicieron notables a partir del día 200). En el tratamiento I el número de hojas al comienzo fue menor a las 35, sin diferencias entre las plantas R- y R+, situación que se mantuvo hasta que las plantas quedaron sin hojas. En el tratamiento S el número de hojas al comienzo fue menor a 50 en cada planta, sin diferencias entre las plantas R- y R+. Las diferencias entre las plantas R- y R+ comenzaron a ser notables a partir del día 215 (Figura 17).

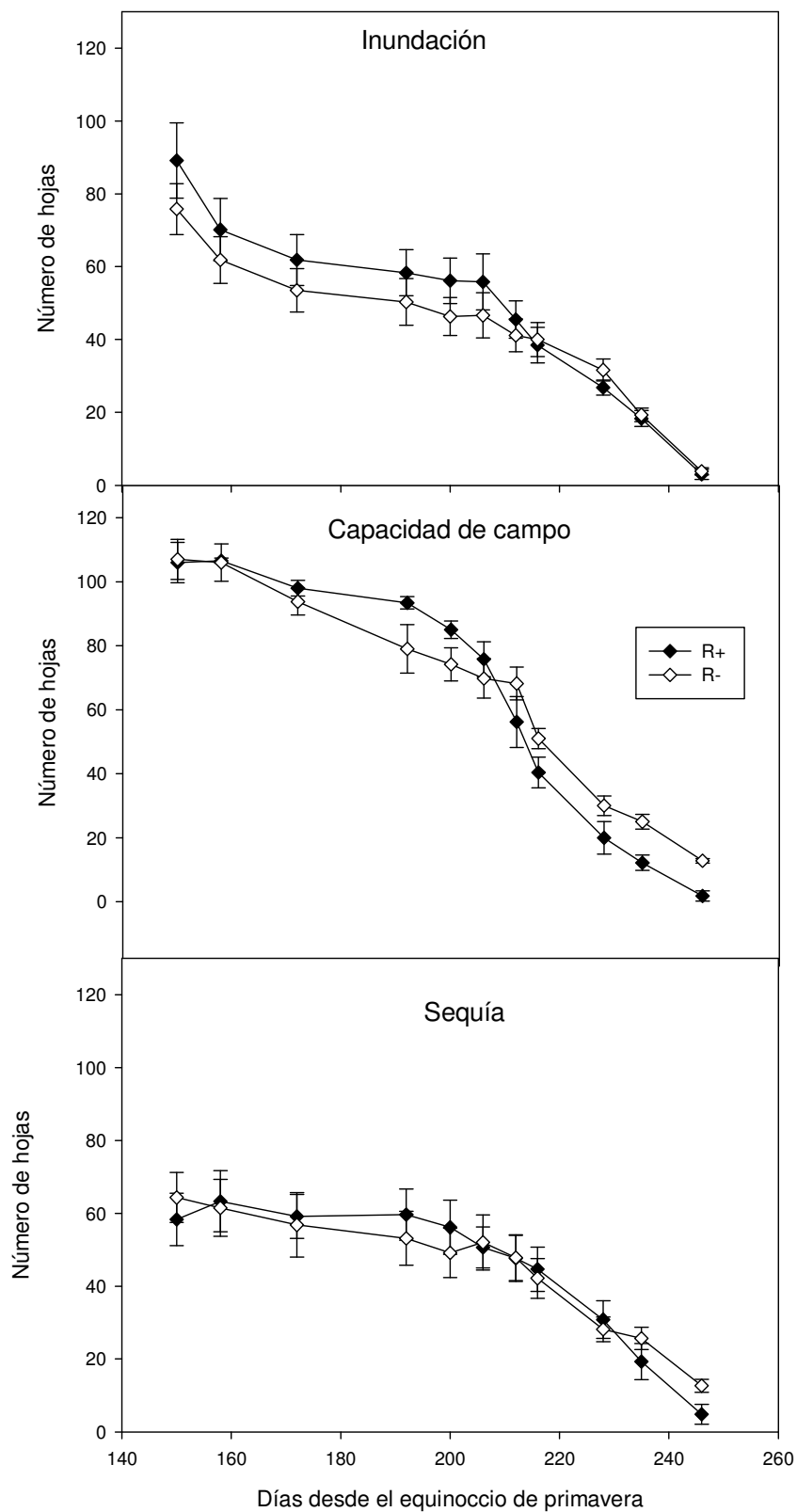
En el ensayo 4, para el clon 'Australiano 106/60', el número de hojas por planta estuvo fuertemente influenciado por el tratamiento hídrico al comienzo de las mediciones. En este sentido en el tratamiento CC el número de hojas fue superior a 100, en el tratamiento I varió entre las 80-90 hojas por planta y en el tratamiento S fue de 60. A partir del momento en que se comenzó a registrar el número de hojas se observó una caída constante en el número de hojas a lo largo de tiempo, existiendo diferencias entre las plantas R- y R+ sólo en los últimos días del tratamiento CC. Para los tratamientos I y S no hubo diferencias en el número de hojas entre las plantas R- y R+ (Figura 18).

La evolución del daño en el fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) a lo largo de 30 días (desde el día 185 hasta el día 216 desde el equinoccio de primavera) del clon Onda, fue muy similar en los tratamientos CC y S. Por un lado, las hojas R- de ambos tratamientos presentaron un valor de  $F_v/F_m$  elevado y prácticamente constante a lo largo del período de mediciones. Sin embargo, en las hojas R+ puede apreciarse una continua disminución de  $F_v/F_m$ , llegando a valores menores a 0,6. En los tratamientos I se produjo una constante disminución de  $F_v/F_m$ , tanto en las plantas R- como R+, y las mediciones debieron interrumpirse en el día 21 debido a la abscisión de todas las hojas marcadas (Figura 19).

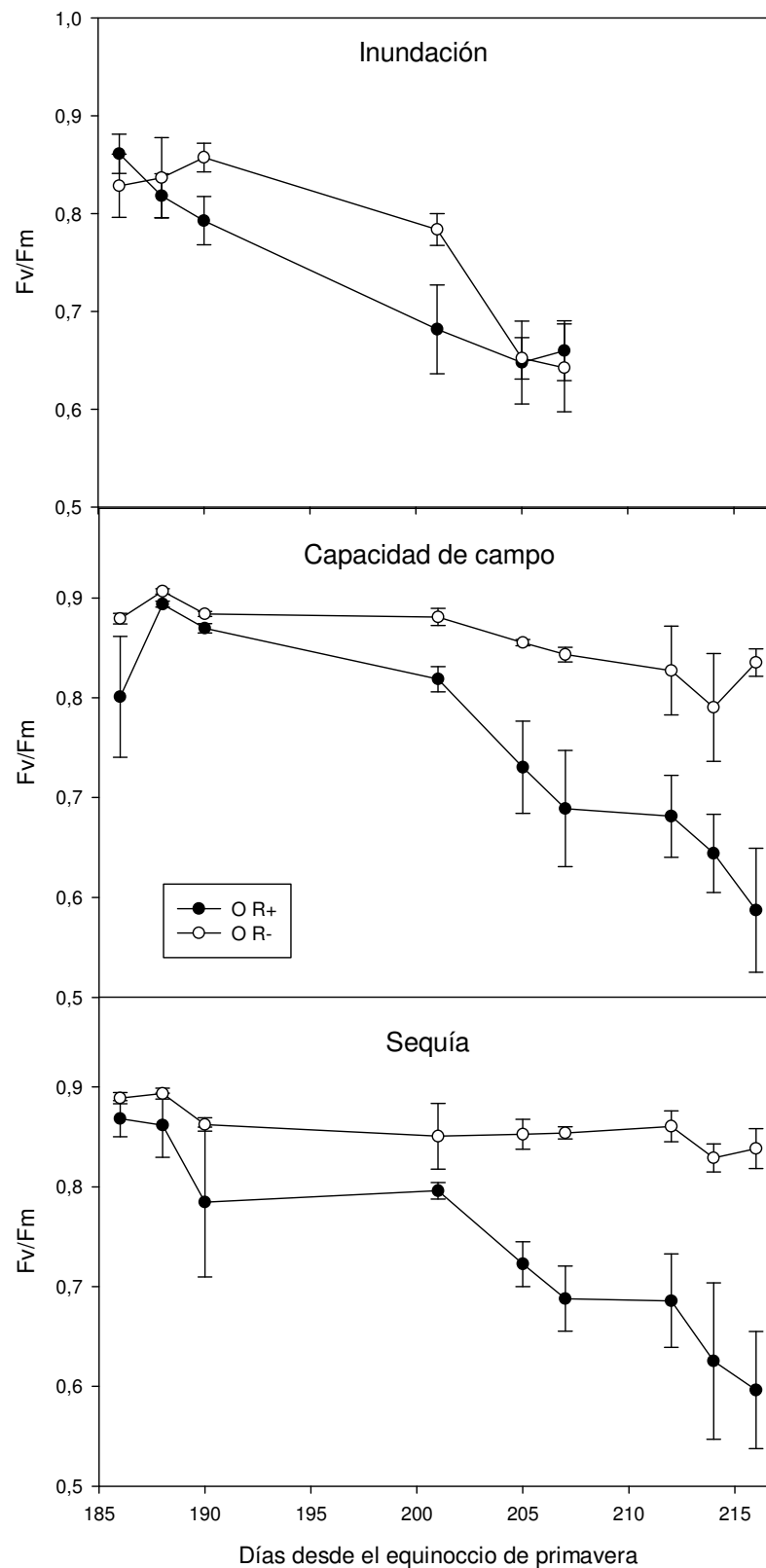
Para el clon 'Australiano 106/60', en este mismo ensayo, el comportamiento en la evolución de  $F_v/F_m$  fue similar al del clon Onda aunque las caídas en  $F_v/F_m$  fueron sutiles. Las hojas R- de los tratamientos CC y S presentaron un valor de  $F_v/F_m$  prácticamente constante, cercano a 0,9. Por el contrario, en las hojas R+ puede apreciarse una continua disminución de  $F_v/F_m$ , llegando a valores menores a 0,8. En cambio, en los tratamientos I se produjo una constante disminución de  $F_v/F_m$ , tanto en las plantas R- como R+, llegando a valores de 0,8 a los 30 días (Figura 20).



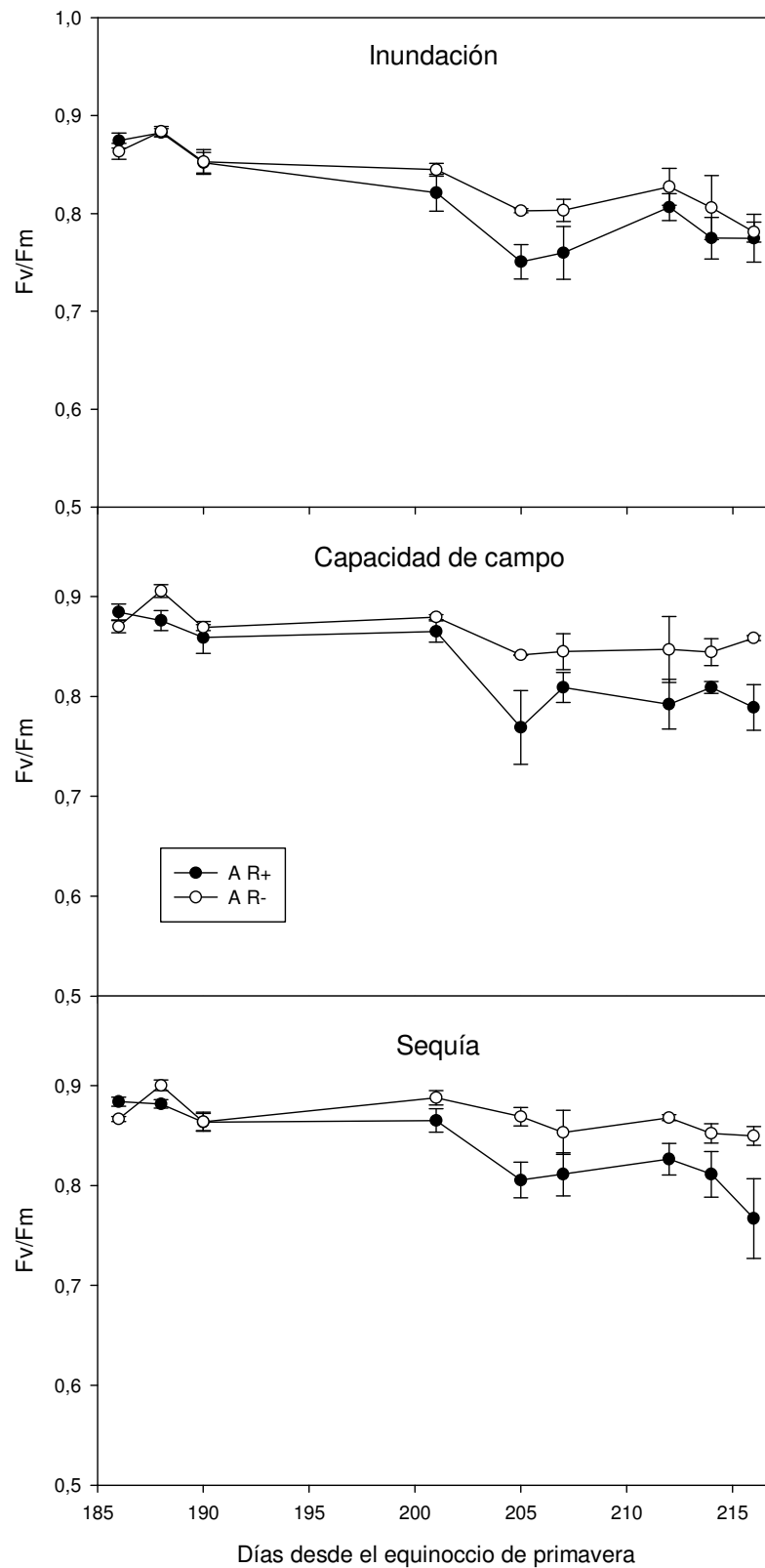
**Figura 17:** Número de hojas a lo largo del tiempo para los diferentes tratamientos hídricos del clon Onda con sus respectivos errores estándar (Ensayo 4). Plantas con roya (R+) y plantas sin roya (R-). En el eje de las ordenas se representan días desde el equinoccio de primavera.



**Figura 18:** Número de hojas a lo largo del tiempo para los diferentes tratamientos hídricos del clon 'Australiano 106/60' con sus respectivos errores estándar (Ensayo 4). Plantas con roya (R+) y plantas sin roya (R-). En el eje de las ordenas se representan días desde el equinoccio de primavera.



**Figura 19:** Evolución del daño en el fotosistema II (Fv/Fm) en hojas del clon Onda con sus respectivos errores estándar (Ensayo 4). Plantas con roya (R+) y plantas sin roya (R-). En el eje de las ordenadas se representan los días desde el equinoccio de primavera a través de los cuales se realizó el seguimiento de Fv/Fm.



**Figura 20:** Evolución del daño en el fotosistema II (Fv/Fm) en hojas del clon 'Australiano 106/60' con sus respectivos errores estándar (Ensayo 4). Plantas con roya (R+) y plantas sin roya (R-). En el eje de las ordenas se representan los días desde el equinoccio de primavera a través de los cuales se realizó el seguimiento de Fv/Fm.

## 5.5- Discusión.

### 5.5.1- Caracterización de los tratamientos hídricos.

En el clon Onda, la inundación produjo una reducción en la fotosíntesis neta (Figura 1a), en la conductancia estomática (gs, Figura 2b) y en el área foliar (Figura 2a). Sin embargo, el contenido de clorofilas no cambió (Figura 1b). Resultados similares se observaron en otros clones de álamo y con diferente duración de la inundación. Por ejemplo, luego de dos semanas bajo inundación, la fotosíntesis se redujo en un 60 % en los clones I-488, Rimini y D-64 (Bejaoui *et al.*, 2006). Sobre 14 clones ensayados, luego de 30 días de inundación, se encontró una disminución de gs en todos los clones mientras que el contenido de clorofilas se redujo sólo en 8 clones (Luquez *et al.*, 2012). La disminución en la fotosíntesis neta está fuertemente relacionada con gs, y posiblemente la fotosíntesis en estos eventos de inundación está limitada por gs. En los clones Alton, 149-82 y Stoneville 67, con 20 días de inundación, se encontró una fuerte reducción tanto en la fotosíntesis neta como en gs, con una correlación positiva entre ambos parámetros (Rodríguez, 2014). En cuanto a la disminución en el área foliar, nuestros resultados van en el sentido de lo reportado en la bibliografía. En los 14 clones de *Populus deltoides* utilizados por Luquez *et al.* (2012) se observó una disminución en el área foliar por la inundación.

En el caso de la sequía, no se produjeron cambios en la fotosíntesis (Figura 1a) ni gs (Figura 2b) pero se observaron cambios en el contenido de clorofilas (Figura 1b) y en el área foliar (Figura 2a). La falta de cambios en la fotosíntesis y gs es contraria a lo reportado para *P. cathayana*, especie en la que se observó una reducción en la fotosíntesis del 30 - 35 % asociado a una reducción en gs del 40 - 50 % en plantas expuestas a sequía (Xu *et al.*, 2008). En dos clones de *Populus x canadensis* (clones Dorksamp y Luisa Avanzo) se produjo una disminución muy marcada de gs inmediatamente después a la imposición de la sequía (Marron *et al.*, 2003). En el mismo sentido, en tres poblaciones diferentes de *P. davidiana* se demostró una disminución de entre el 30 y 70 % en la fotosíntesis debido a la sequía (Zhang *et al.*, 2004). Sin embargo, en dos poblaciones de *P. cathayana* luego de tres meses de sequía se encontró que la fotosíntesis se redujo en un 35 % cuando la población provenía de una zona húmeda mientras que en la otra población proveniente de una zona menos húmeda la fotosíntesis no cambió (Huang *et al.*, 2009). El área foliar se redujo considerablemente en nuestro ensayo (75

%), de igual forma que en *P. cathayana* y *P. przewalskii* luego de 5 meses bajo sequía, aunque la reducción en el área foliar fue superior al 90 % en ambos clones (Yin *et al.*, 2005). Sobre otro ensayo en *P. cathayana*, luego de 5 meses, también se observó una reducción del área foliar del 85-90 % (Xu *et al.*, 2008). De lo anterior podemos decir, que bajo eventos de sequía prolongados, el clon Onda reduce fuertemente el área foliar, esto permite mantener un mínimo de hojas en condiciones hídricas semejantes a las de una planta con buena disponibilidad de agua (esto es, mantener la fotosíntesis,  $g_s$  y el nivel de clorofilas). Posiblemente si las observaciones se realizan inmediatamente luego de la imposición de la sequía, como el área foliar no se reduce instantáneamente, se podría observar una reducción en la tasa de intercambio gaseoso. Esta reducción en la tasa de fotosíntesis neta y  $g_s$  debido a la baja disponibilidad de agua en el suelo se observó en las mediciones realizadas a campo y son la causa de la mayor variabilidad en el intercambio gaseoso para niveles similares de la enfermedad (capítulo 2).

#### 5.5.2- Cambios en el crecimiento y en la dinámica de nutrientes debido a la interacción entre defoliación y el estrés hídrico.

No hubo interacción entre defoliación y estrés hídrico sobre el crecimiento en altura (Figura 3) y DAC (Figura 4) ni sobre la acumulación de biomasa aérea (Figura 5). El estrés por inundación produjo un aumento en altura, DAC y biomasa aérea en relación a las plantas a capacidad de campo, mientras que el estrés por sequía tuvo el efecto contrario. La defoliación produjo una reducción en altura (Figura 3) y biomasa aérea (Figura 5), independientemente de la condición hídrica. Sin embargo, el efecto del estrés hídrico fue más marcado que la defoliación. El aumento en el crecimiento aéreo cuando las plantas estaban inundadas fue contrario a lo reportado para los clones Alton, 149-82 y Stoneville 67, en los que no hay cambios (clon Alton) o se produjo una reducción luego de 20 días bajo inundación (Rodríguez, 2014). Asimismo, en los clones Alton, A106-60, A129-60, Catfish 2, Stoneville 67, Carabelas INTA, 2-82, 20-82, 21-82, 89-82, 149-82, 150-82, Conti 12 y SIA 22-85, se produjo una reducción en la altura de entre el 20 % y el 70 % según la susceptibilidad, luego de 30 días de inundación (Luquez *et al.*, 2012). Posiblemente, el tiempo en el cual las plantas se encuentran inundadas explique la respuesta encontrada. La inundación produce un aumento en la relación tallo-raíz, la cual se maximiza luego de un periodo prolongado de estrés como el nuestro donde prácticamente todo el carbono asimilado se acumula en la parte aérea. Si bien no hay reportes similares en álamos, en sauces se observan estos resultados. Luego de un período de



100 días de inundación, la altura de las plantas fue levemente mayor bajo inundación de los clones 'Ragonesa 131-27 INTA' y 395-112 (Cerrillo *et al.*, 2013). También se observó un aumento de la altura en plantas de sauce sometidas a inundación durante toda la temporada de crecimiento al compararlas con plantas que tenían entre 10 y 30 cm de suelo no saturado (Stromberg, 1997).

En cambio, la disminución en crecimiento debido a la sequía encontrada va en el sentido de lo reportado por otros autores. En *P. cathayana* y *P. przewalskii* se produjo una reducción en altura superior al 85 % y en la acumulación de biomasa aérea superior al 90 % (Yin *et al.*, 2005). También se observó reducción en altura de un 55 % y 80 % en plantas macho y hembras respectivamente de *P. cathayana* (Xu *et al.*, 2008). En ambos ejemplos, el nivel de sequía representaba un 25 - 30 % de la capacidad de campo cuando en nuestro ensayo fue del 50 %, es decir, el estrés impuesto fue más leve al igual que la reducción en crecimiento. La reducción en crecimiento debido a la defoliación depende del nivel de defoliación. Por ejemplo, en plantas de *Populus alba* una defoliación del 25 % produjo una reducción del crecimiento del 20 %, mientras que una defoliación del 100 % redujo el crecimiento más del 80 % (Rubio *et al.*, 2013). Observaciones similares se realizaron en plantas de *Populus tremuloides*, en las que la reducción en el diámetro a la altura del cuello fue del 50 % en el primer año luego de la defoliación y del 75 % al segundo año luego de una defoliación por año (Moulinier *et al.*, 2014). En *Populus x canadienses* también se observó una reducción en el crecimiento en plantas defoliadas, la cual se acrecentó a medida que pasan los años (Kosola *et al.*, 2001).

Este mismo comportamiento observado en la biomasa aérea se reprodujo con los niveles de nutrientes. Existió un efecto muy marcado de los tratamientos hídricos y de la defoliación sobre la concentración y contenido de N y P en tallos, sin interacción entre los tratamientos (Figura 9 y Figura 10). Observamos un aumento en la concentración de N bajo inundación, dando como resultado que el contenido de N acumulado en la biomasa aérea fuera mayor en este tratamiento.

Contrariamente a lo que ocurre en la biomasa aérea, en la acumulación de biomasa subterránea existió una interacción entre los factores defoliación y estrés hídrico (Figura 6). La defoliación produjo una reducción del 40 % en la acumulación de biomasa subterránea en las plantas a capacidad de campo, mientras que la reducción fue mínima para las plantas en sequía y no hubo cambios cuando las plantas se encontraban inundadas. Sin embargo, las plantas bajo inundación presentaron una reducción mayor al 75 % en la acumulación de

biomasa subterránea, mientras que en las plantas con sequía la reducción fue del orden del 50 %, ambas con respecto a las plantas a capacidad de campo. La disminución en la acumulación de biomasa subterránea por estrés hídrico, ya sea por inundación o sequía, se encuentra ya reportada por otros autores. La reducción debida a la inundación fue del 25 %, 50 % y 66 % en los clones Alton, 149-89 y Stoneville 67, respectivamente (Rodriguez, 2014). En *P. cathayana* y *P. przewalskii* la reducción en la acumulación de biomasa subterránea debido a la sequía fue mayor, del 75 % y 95 % respectivamente (Yin *et al.*, 2005). Asimismo, la reducción en la acumulación de biomasa subterránea debido a la defoliación se encuentra documentada. En *Populus x canadienses* se produce una reducción superior al 50 % en el crecimiento de nuevas raíces cuando las plantas son defoliadas (Kosola *et al.*, 2001), mientras que en *Populus tremuloides* la reducción en el crecimiento de raíces se acentúa al aumentar el nivel de defoliación (Erbilgin *et al.*, 2014).

A nivel de raíces, la concentración de N y P sólo fue modificada por los tratamientos hídricos (excepto la concentración de P en raíces finas) mientras que para los contenidos de nutrientes hubo interacción entre los tratamientos hídricos y la defoliación (Figuras 11 a 14). Las plantas bajo sequía tuvieron concentraciones de N y P mayores a la de las plantas a capacidad de campo. Sin embargo, está reportado en *Populus x canescens* (*P. alba* × *P. tremula*, INRA clon 717-1B4) que una sequía de 20 días no produce cambios en las concentraciones de estos nutrientes (Danielsen & Polle, 2014). La falta de respuesta a la defoliación, en la concentración de N, también fue observada en *Populus tremuloides* independientemente de las condiciones nutricionales del suelo (Stevens *et al.*, 2014).

No hay estudios en la bibliografía sobre la combinación (y posible interacción) entre estrés hídrico y defoliación para *Populus* sp., sin embargo comparaciones con otras especies arbóreas son posibles. En *Quercus petrea* y *Quercus robur*, la defoliación seguida de estrés por sequía no producen cambios en el peso de raíces, pero ambas especies la reducción causada por la defoliación es muy marcada bajo las dos condiciones hídricas (Gieger & Thomas, 2002). En *Taxodium distichum* y *Nyssa aquatica*, se encontró que la inundación produce una reducción en la altura y en la acumulación de biomasa total, produciendo la defoliación del 100 % una reducción adicional (Effler & Goyer, 2006). Siguiendo la idea planteada en la introducción (Capítulo 1) se puede describir el efecto de ambos factores de estrés como sinérgico, aditivo o antagónico, de acuerdo a la magnitud de los cambios de los dos estreses en conjunto en relación al efecto aislado de cada factor (Bansal *et al.*, 2013). En nuestro caso podemos decir que en el componente aéreo (altura, biomasa, concentración y contenido de nutrientes) ambos factores de estrés se comportan como aditivos, donde el efecto de la

defoliación es similar bajo las diferentes condiciones hídricas. Sin embargo, en el componente subterráneo (biomasa y contenido de nutrientes) el efecto es antagónico, donde la reducción adicional aportada por la defoliación es mínima (sequía) o nula (inundación).

La concentración de N y P fue mayor en las hojas verdes en el tratamiento de sequía (Figura 7a y 8a). En clones de *P. balsamífera*, *P. trichocarpa* y el híbrido *P. trichocarpa* x *P. deltoides* fue encontrado un aumento en la concentración de N cuando las plantas se encontraban con baja disponibilidad de agua se (Karacic & Weih, 2006). En *Quercus ilex* se observó un aumento en la concentración de P, luego de un estrés prolongado por sequía (Sardans & Peñuelas, 2007). Este aumento en los niveles de nutrientes refuerzan la respuesta encontrada a la sequía del clon Onda, que consiste en menor área foliar pero con tasas de fotosíntesis y gs similares a las hojas de las plantas a capacidad de campo. Es decir, que la reducción en el consumo de agua en situación de sequía provoca una reducción del área foliar transpirante, y no por cambios de la tasa de intercambio gaseoso por unidad de área foliar.

En cuanto a las concentraciones de nutrientes en hojas caídas, encontramos interacción entre los tratamientos hídricos y la defoliación (Figura 7b y Figura 8b), de donde podemos sacar algunos comportamientos generales. Primero, la concentración de N en el tratamiento CC D- es similar a la de los tratamientos O R-N- y O R-N+ (Cap. 4, Figura 2), dándonos una idea de la capacidad de reabsorción de N y P para el clon, la cual se encuentra en el rango de lo reportado para *P. deltoides*, *P. nigra* y *P. tremuloides* (Killingbeck, 1996). Esta capacidad de reabsorción de N se reduce considerablemente cuando las plantas experimentan inundación y es nula en el caso del P. Resultados similares se observan en *Populus* sp. en un gradiente de inundación, al aumentar la duración de la inundación, las hojas caen con mayor contenido de N y P (González *et al.*, 2010). Segundo, la concentración de nutrientes de las hojas senescentes en el tratamiento S D- es mayor a la concentración de las hojas S D+ e incluso a las de hojas verdes. Esto se debe a que si bien las plantas S D- se fueron adaptando a la falta de agua (reduciendo el área foliar y aumentando la concentración de nutrientes en las hojas verdes remanentes). Al momento en que comienza la caída otoñal de las hojas, el nivel de estrés por sequía era más marcado en las plantas intactas que en las defoliadas, porque las intactas tenían más área foliar remanente. Por lo tanto, el proceso de retrasilocación en las plantas intactas fue más corto o no existió, quedando más N remanente en las hojas caídas. Este comportamiento fue observado en diferentes especies de *Populus* bajo condiciones de estrés por sequía contrastantes, donde se observó que un estrés por sequía severo inhibió la retrasilocación de nutrientes (Harvey & van den Driessche, 1999).

Como consecuencia de los cambios en los contenidos analizados a nivel de órganos, la defoliación del 50 % redujo el N y P acumulado en tallos y raíces que estarán disponibles para sostener el crecimiento inicial en la temporada siguiente de crecimiento. La reducción se produjo independientemente de la condición hídrica en que estaba creciendo la planta. Sin embargo, las plantas inundadas acumularon más N total que las plantas a capacidad de campo o bajo sequía. Esto indica que la inundación estimuló la capacidad de absorber N que finalmente se acumuló en los tejidos de reserva. Este comportamiento ha sido reportado en varias especies tolerantes a la inundación (Kozlowsky, 1997). Sin embargo, la defoliación en las plantas I reduce en más del 100 % la acumulación de N (Tabla 1). En el caso de las plantas CC la defoliación reduce las reservas de N en un 50 % aproximadamente, mientras que en el caso de las plantas S, la defoliación sólo reduce un 20 % las reservas de este nutriente. En el caso del P, los dos estreses reducen el 20 % la acumulación de P, mientras que en las plantas CC la reducción es del 40 % (Tabla 1). Esto significa que la pérdida del 50 % de las hojas es más costosa en términos de N en las plantas inundadas, seguido por las que crecen a capacidad de campo y es menor en las plantas bajo sequía. Esto se refleja en la menor concentración de N en hojas senescentes de plantas expuestas a la sequía y defoliadas, con respecto a las no defoliadas (Figura 7). Las diferencias en la capacidad de retranslocación, la materia seca acumulada en cada órgano y la concentración en los tejidos redundan en que, en caso de ocurrir defoliación, el contenido total de N y P en las plantas es muy similar en las tres condiciones hídricas.

### 5.5.3- Interacción entre roya y estrés hídrico. Evolución de la roya y cambios asociados a nivel foliar.

El nivel de incidencia de roya no fue modificado por la disponibilidad de agua en el suelo en ninguno de los clones (Figura 15 a y b). La severidad tampoco fue modificada por el estrés hídrico en el clon 'Australiano 106/60' (Figura 16b), sin embargo, en el clon Onda la severidad dependió de las condiciones hídricas (Figura 16a). La severidad de la enfermedad fue mayor en las plantas a capacidad de campo, levemente menor bajo sequía y se redujo un 50 % aproximadamente en las plantas bajo inundación. En este sentido, en un ensayo realizado sobre 31 clones de *Populus* sp. se observó un aumento en el nivel de roya cuando las plantas eran irrigadas al compararlas con plantas que no recibían riego durante los tres años en que se realizó el ensayo (Coyle *et al.*, 2006). Si bien nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Coyle y colaboradores (2006) ciertas consideraciones deben ser tenidas en

cuenta. Por un lado, la imposición del estrés hídrico en nuestro ensayo se realizó en el contenedor por lo que no fue controlada la humedad relativa del aire, factor que cambia considerablemente cuando se produce estrés hídrico en condiciones naturales. Es decir, situaciones de sequía en el suelo van acompañadas de una humedad relativa baja en el aire y situaciones de inundación en el suelo van acompañadas de una humedad relativa alta en el aire. Está comprobado que para que la infección por roya prospere es necesario al menos 6 horas de humedad relativa cercana al 100 % sobre la hoja. Además, al variar la humedad relativa en cada tratamiento hídrico, es de esperar que la conductancia estomática sea modificada, característica principal en el éxito de la infección que se realiza de forma pasiva a través de los estomas (Laurans & Pilate, 1999; Spiers & Hopcroft, 1988). Seguramente si hubiéramos acompañado la imposición del estrés hídrico en el contenedor de una humedad relativa del aire acorde a la condición hídrica se hubieran incrementado las diferencias de severidad entre los tratamientos.

Las variaciones en el número de hojas y  $F_v/F_m$  estuvieron asociadas a los niveles de severidad descriptos, debido a la interacción entre el estrés hídrico y roya. En los tratamientos a capacidad de campo se observó mayor severidad de roya y caída anticipada de las hojas. La defoliación anticipada fue levemente menor en las plantas bajo sequía, y desapareció bajo inundación. Este comportamiento fue observado en ambos clones, pero más evidentemente en el clon Onda (Figura 17 y Figura 18). Los tratamientos a capacidad de campo y sequía se comportaron de igual forma, en la dinámica de  $F_v/F_m$ . A medida que el nivel de roya aumentó, el daño al aparato fotosintético (reflejado en menor  $F_v/F_m$ ) fue mayor, mientras que en los tratamientos inundados el nivel de daño no fue afectado por roya pero sí por el exceso de agua (Figura 19 y Figura 20).

## 5.6- Conclusiones.

La altura y la acumulación de biomasa en órganos aéreos se reduce fuertemente por el estrés por sequía, mientras que la inundación produce un aumento del crecimiento aéreo. La defoliación produce una reducción del crecimiento aéreo similar en todos los tratamientos hídricos. Sin embargo, existe interacción entre el estrés hídrico y la defoliación en la acumulación de biomasa subterránea. Se produce una fuerte reducción en la acumulación de biomasa debido a la defoliación cuando las plantas crecen sin limitaciones hídricas, es mínima cuando las plantas se encuentran bajo sequía y desaparece cuando las plantas están bajo inundación.

La acumulación total de N y P se reduce con la defoliación en todos los tratamientos hídricos. Las plantas inundadas acumulan más N que las plantas a capacidad de campo o bajo sequía, pero la defoliación reduce a la mitad esta acumulación.

Por lo tanto, si la enfermedad produjera niveles de defoliación similar bajo las 3 condiciones hídricas, el crecimiento aéreo se reduciría de manera similar mientras que el crecimiento radical sería más afectado en las plantas a capacidad de campo que en plantas estresadas.

A nivel foliar, la capacidad de las hojas de retranslocar el N y P antes de la abscisión está determinada por el estrés hídrico. Esta capacidad disminuye fuertemente en las hojas bajo inundación o sequía en comparación con las hojas de las plantas a capacidad de campo.

En el clon Onda, las severidad de la roya es menor cuando las plantas se encuentran bajo estrés hídrico (tanto sequía como inundación). Como consecuencia, la caída anticipada de hojas y el daño en el aparato fotosintético son mayores cuando las plantas se encuentran con buena disponibilidad de agua. En el clon 'Australiano 106/60', el nivel de severidad es más bajo y las diferencias entre los tratamientos hídricos son mínimas. Por lo tanto, la magnitud en la caída anticipada de hojas y el nivel de daño son menores. En ambos clones, cuando las plantas están inundadas, la roya no produce cambios en estas variables.

## **Capítulo 6: Consideraciones finales.**

## 6.1-Discusión general.

La roya es considerada una de las enfermedades más importantes de los álamos en el mundo porque produce importantes pérdidas de rendimiento en las plantaciones comerciales. La magnitud de estas pérdidas dependen de la susceptibilidad diferencial de los clones utilizados y del ambiente en el cual se desarrollan. En el marco de esta tesis se utilizaron dos clones que presentan un comportamiento diferente ante la roya. Por un lado el clon Onda, el cual 'a priori' se consideró el clon más susceptible y por el otro, el clon 'Australiano 106/60', considerado el clon menos susceptible.

En plantas a campo bajo secano que sufrieron la enfermedad durante 4 estaciones de crecimiento la roya redujo el crecimiento del clon Onda, mientras que el crecimiento del clon 'Australiano 106/60' no fue afectado (ensayo 1). Esta reducción en el crecimiento se refleja en la reducción en altura, DAP, densidad básica de la madera y, como consecuencia, menor biomasa acumulada. Sin embargo, en plantas de un año, la roya redujo el crecimiento en ambos clones en igual magnitud si la disponibilidad de N era alta, mientras que cuando la disponibilidad de N era baja la reducción en crecimiento sólo se produjo en el clon 'Australiano 106/60', incluso cuando los niveles de severidad en el clon Onda fueron mayores (ensayo 2). Este comportamiento puede deberse a las condiciones ambientales y experimentales en que crecieron las plantas, principalmente al reducido distanciamiento entre las plantas, que facilitó el desarrollo de la enfermedad y produjo en las plantas fuerte competencia por luz. Por lo tanto, si entendemos la susceptibilidad en función de la severidad de la enfermedad, el clon Onda es el más susceptible, pero si la entendemos en función de los daños ocasionados, bajo ciertas condiciones ambientales, ambos clones son igualmente susceptibles o incluso el 'Australiano 106/60' es más susceptible.

La menor acumulación de biomasa debido a la roya puede explicarse en función de los cambios que se producen tanto en la fisiología foliar como en la dinámica foliar y nutrientes. La roya afecta la fisiología de la hoja en diferente magnitud según el grado de infección. La fotosíntesis neta se reduce en hojas enfermas, así como el contenido de clorofilas, la tasa de transporte de electrones y el rendimiento cuántico del fotosistema II. Por el contrario, la respiración aumenta. Todos estos cambios son más acentuados en el clon Onda. Si bien la reducción en la fotosíntesis neta está fuertemente asociada a la pérdida de la integridad del aparato fotosintético, la reducción en la fotosíntesis es notoria antes de que comiencen los



daños de la enfermedad en la integridad del aparato fotosintético. Esto se debe a que la enfermedad reduce la capacidad de intercambio gaseoso, reflejado en la reducción de conductancia estomática. Asimismo, la reducción en la conductividad hidráulica de las hojas enfermas, refleja que la enfermedad altera la estructura interna de la hoja, de tal manera que también se reduce la movilidad del agua en fase líquida.

El otro mecanismo fisiológico que explica la reducción en el crecimiento, es debido a que la roya reduce el número de hojas presentes en las plantas, ya que produce defoliación anticipada. En el clon Onda la defoliación se observó en todos los ensayos donde fue medida (ensayos 2 y 4). Sin embargo, en el clon 'Australiano 106/60' la roya produjo defoliación anticipada sólo en el ensayo 2, en el que el nivel de infección de la enfermedad fue mayor. En los dos clones, las hojas caen con mayor concentración de nitrógeno (ensayo 2), contenido en la masa fúngica o en metabolitos foliares que no fueron completamente dismantelados en el proceso de senescencia. Las hojas no sólo caen con mayor contenido de N sino que también lo hacen con un mayor contenido de P (ensayo 3, plantas a capacidad de campo).

Las consecuencias de la enfermedad en la fisiología foliar y la removilización de nutrientes reducen la acumulación de nitrógeno en los tejidos de reserva (raíces y tallos) en ambos clones. Sin embargo, el comportamiento en cada clon es diferente. En el clon 'Australiano 106/60' la menor acumulación de N está fuertemente asociada a un menor crecimiento, ya que las concentraciones de N en los tejidos de reserva no son modificadas por la enfermedad. En cambio, en el clon Onda se produce una reducción en la concentración de N. En este último clon, cuando la roya produce una reducción de crecimiento, la reducción en la concentración de nutrientes es moderada y se evidencia sólo a nivel radical. Sin embargo, cuando no se observan cambios en el crecimiento, la reducción en la concentración de N es muy marcada, tanto a nivel radical como aéreo.

La fertilización con N estimuló el crecimiento y las concentraciones de este nutriente en los tejidos de reserva de ambos clones. Sin embargo, no hay interacción entre la roya y la disponibilidad de N. La mayor disponibilidad de N no modificó la incidencia y severidad de la enfermedad, por lo que la reducción porcentual en crecimiento debido a la enfermedad fue similar en plantas con alta y baja disponibilidad de N. Estos resultados indican que la mejora en el estado nutricional de la plantas no aumentó la capacidad de defensa de la planta ni exacerbó el crecimiento del hongo.

En el caso en que la enfermedad se combinó con estrés hídrico por sequía o inundación, el desarrollo de la enfermedad fue menor que cuando las plantas se encontraban

a capacidad de campo en ambos clones. Como consecuencia, la caída anticipada de las hojas y el daño en el aparato fotosintético debidos a la enfermedad son mayores cuando las plantas se encuentran con buena disponibilidad de agua, se vuelven mínimos cuando las plantas están bajo sequía y no hay efectos de la enfermedad bajo inundación (ensayo 4). La falta de efecto de la enfermedad en plantas estresadas se debe a que ambos estreses reducen la producción de hojas, aumentan la caída foliar y producen un daño importante en la integridad del aparato fotosintético. Es así que la enfermedad no tiene un efecto aditivo sobre el estrés hídrico.

Al evaluar la interacción entre la defoliación del 50 % y el estrés hídrico, que simula ataques de roya de intensidad similar en las 3 condiciones hídricas, el crecimiento se reduce más en plantas a capacidad de campo que en plantas bajo estrés hídrico. Por otro lado, a capacidad de campo la severidad de la enfermedad es mayor (ensayo 4). En consecuencia, las plantas con buena disponibilidad hídrica probablemente serán más afectadas por la roya, porque la severidad de la enfermedad será mayor y las consecuencias de la defoliación serán más graves que en plantas que sufren algún estrés hídrico.

La reducción en el crecimiento que produce la roya no se debe principalmente a la pérdida de área foliar, sino que los efectos de la enfermedad en la fisiología de la hoja y en la removilización de nutrientes explican un porcentaje elevado de esta reducción. Esta afirmación se respalda en que la defoliación del 50 % sin roya reduce el crecimiento un 25 % (ensayo 3, plantas a capacidad de campo) mientras que con una defoliación similar producida por la enfermedad se reduce el crecimiento un 50 % (ensayo 2). Posiblemente, la diferencia se debe a que cuando se reduce el área foliar experimentalmente la planta sólo pierde los nutrientes contenidos en las hojas que fueron removidas. Por el contrario, en las plantas enfermas el crecimiento del hongo demanda nutrientes que son abastecidos durante todo el ciclo de la roya. Parte de estos nutrientes se pierden a través de la liberación de esporas y otra queda retenida al caerse las hojas enfermas. Es por eso que el efecto de la enfermedad es mayor a una defoliación puntual de igual magnitud.

## 6.2- Contraste de hipótesis.

**Hipótesis 1.1: La roya produce una disminución en el crecimiento y en la densidad de la madera, de mayor magnitud en el clon más susceptible.**

En plantas de 1 año la roya produce una reducción en la acumulación de biomasa similar en ambos clones del orden del 50 %, si la disponibilidad de N en el suelo es alta. Sin embargo, si la disponibilidad de N es baja, en las plantas del clon Onda no hay reducción en el crecimiento por la enfermedad.

En plantas del clon Onda, luego de 4 años creciendo con roya a campo bajo secano, se produce una reducción en altura y DAP del orden del 50 % acompañado de una reducción en la densidad básica de la madera y como consecuencia una reducción en la acumulación de biomasa del 75 %. Por el contrario, en el clon 'Australiano 106/60' sólo se producen diferencias en altura entre plantas sanas y enfermas.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada se rechaza, porque la susceptibilidad de los clones a la enfermedad está condicionada por el ambiente.

**Hipótesis 1.2: Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno por la fertilización, las diferencias en el crecimiento entre plantas sanas y enfermas es menor, porque mejora la capacidad de las plantas para defenderse de la roya.**

La mayor disponibilidad de nitrógeno produce un aumento del crecimiento (altura, DAP y acumulación de biomasa) en ambos clones. Sin embargo no hay interacción entre la mayor disponibilidad de nitrógeno y la afección por roya: la reducción en crecimiento producida por roya es de magnitud similar bajo las diferentes disponibilidades de nitrógeno.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada es rechazada.

**Hipótesis 2: La magnitud de los cambios ocurridos en los parámetros fisiológicos a nivel foliar se relaciona con el grado de infección.**

La roya produce una reducción en la fotosíntesis neta, en la tasa de transporte de electrones y en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, en el contenido de clorofilas, en la conductancia estomática y en la conductancia hidráulica de la hoja. Al mismo tiempo, se produce un aumento en la respiración. La mayoría de estos cambios son más notorios en el clon Onda que en el clon 'Australiano 106/60'.

Al analizar la magnitud de los cambios con el nivel de infección, estimado a través de la concentración de glucosamina, encontramos correlaciones negativas a nivel general para la fotosíntesis, la tasa de transporte de electrones y el rendimiento cuántico del fotosistema II y correlación positiva para la respiración. Estas correlaciones se hacen más fuertes cuando se analizan para el clon Onda y prácticamente se pierden en el clon 'Australiano 106/60', debido al bajo grado de infección.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada no es rechazada.

**Hipótesis 3.1: Las hojas atacadas por roya abscinden antes y con mayor contenido de nutrientes que hojas libres de roya.**

En ambos clones se observa que las hojas de las plantas con roya comienzan a abscindir anticipadamente al compararlas con las hojas de plantas sin roya. Asociado a esta caída anticipada, las hojas de las plantas enfermas caen con una concentración de nitrógeno mayor, que es retenido por la masa fúngica o metabolitos de las plantas que no alcanzan a ser removilizados.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada no es rechazada.

**Hipótesis 3.2: Las concentraciones y los contenidos de nutrientes en los tejidos de reserva son menores en las plantas que han tenido roya.**

En el clon Onda, la concentración de nitrógeno en el periodo de reposo otoñal es menor en los tejidos de reserva (raíces finas, raíces gruesas y el tallo) en plantas que presentaron roya durante la estación precedente en comparación con las plantas que no tuvieron roya. En el clon 'Australiano 106/60' no se manifestaron cambios en las concentraciones de nitrógeno. Sin embargo, en ambos clones se reduce la acumulación total de nitrógeno debido a la reducción en el crecimiento.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada es rechazada parcialmente.

**Hipótesis 3.3: Si la disponibilidad de N en el suelo es mayor, la roya tiene menor impacto negativo en la acumulación de este nutriente en los tejidos de reserva.**

Al aumentar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo se produce, en ambos clones, un aumento en las concentraciones de nitrógeno en los tejidos de reserva. El aumento es más marcado en raíces que en tallos. Sin embargo, bajo las diferentes disponibilidades de nitrógeno el efecto de la roya es similar.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada es rechazada.

**Hipótesis 4.1: La disminución en el crecimiento y en la acumulación de nutrientes por efecto de la defoliación es mayor en plantas con buena disponibilidad hídrica.**

Una defoliación del 50 % (simulación de roya) produjo una reducción en el crecimiento aéreo similar en los diferentes tratamientos hídricos. Sin embargo, la reducción en el crecimiento subterráneo está fuertemente influenciada por las condiciones hídricas. La reducción en el crecimiento radical producida por la inundación y la sequía es tan fuerte que no hay efecto de la defoliación. Cuando las plantas se encuentran con buena disponibilidad de agua la defoliación produce una reducción del crecimiento radical muy marcada.

La defoliación reduce la acumulación de nutrientes en todas las condiciones hídricas. La acumulación de P se reduce en igual magnitud en los dos tratamientos de estrés hídrico. La reducción de la acumulación de N es mayor en las plantas inundadas que en las plantas a capacidad de campo, y es menor aún en las plantas bajo sequía.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada es parcialmente rechazada.

**Hipótesis 4.2: El grado de infección por roya es mayor en condiciones de buena disponibilidad hídrica. En consecuencia, el daño y la caída de hojas serán más marcados en plantas a capacidad de campo.**

El nivel de severidad de la enfermedad depende del clon como de las condiciones hídricas. Los niveles de severidad más elevados se presentan, en ambos clones, cuando las plantas se encuentran a capacidad de campo. Como consecuencia, la caída anticipada de hojas y el daño en el aparato fotosintético son mayores bajo esta condición hídrica, son menores cuando las plantas presentan estrés por sequía y no se aprecian cuando las plantas están inundadas.

Teniendo en cuenta estos resultados, la hipótesis planteada no es rechazada.

### 6.3- Conclusión final.

La roya afecta la fisiología de la hoja desde el inicio de la infección ya que reduce el intercambio gaseoso. A medida que la enfermedad se desarrolla, se produce daño en el aparato fotosintético y la posterior abscisión foliar. Las hojas que caen lo hacen con mayor concentración de nutrientes y por lo tanto se reduce la acumulación de nutrientes en los tejidos de reserva de la planta. Como consecuencia de estos procesos el crecimiento se reduce, aunque en diferente magnitud dependiendo del clon y de las condiciones ambientales. Por ejemplo, bajo los efectos de la inundación la roya no produce pérdidas de crecimiento y son mínimas cuando las plantas sufren estrés por sequía.

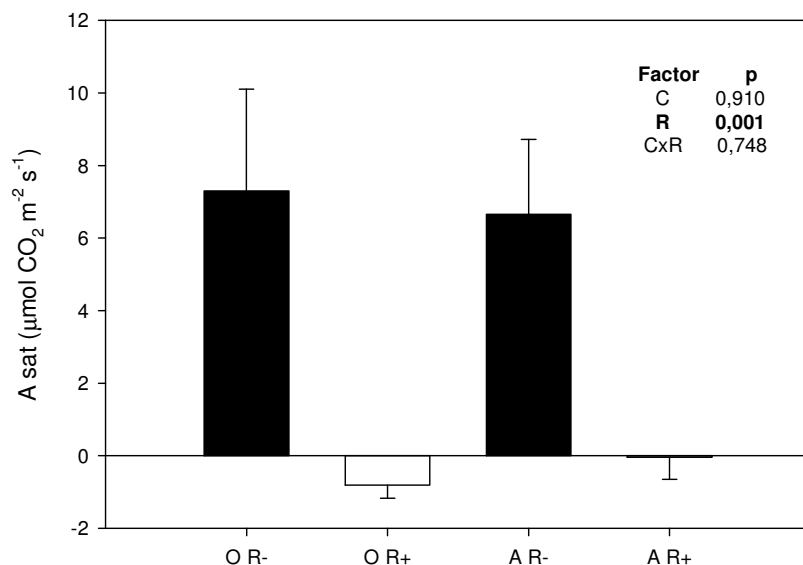
El clon Australiano 106/60 posee mecanismos que frenan el desarrollo fúngico posiblemente asociados a una mayor tasa respiratoria, mayor partición de fotoasimilados a la raíz y concentraciones de nutrientes en los tejidos más estables. Bajo algunas condiciones ambientales y niveles de inóculo elevados, estos mecanismos producen una reducción en el crecimiento a pesar de que los niveles de severidad son relativamente bajos. Por el contrario en el clon Onda, la severidad es mayor y la fisiología de la hoja es más afectada que en el clon Australiano 106/60. Sin embargo, la magnitud en la reducción en el crecimiento por la enfermedad puede ser similar en ambos clones bajo determinadas condiciones ambientales.

La información derivada de esta tesis puede aportar conceptos importantes para la evaluación de mecanismos de control químico de la enfermedad, por ejemplo, tener en cuenta las condiciones ambientales para recomendar o no la aplicación de fungicidas. Por otro lado, en los planes de mejoramiento genético que tengan como objetivo encontrar genotipos más tolerantes a la inundación o a la sequía sería poco relevante considerar la susceptibilidad a la roya. Asimismo, es poco probable que se produzcan daños severos por la enfermedad en ambientes en los que es frecuente que las plantas sufran sequía o inundación, porque la severidad de la enfermedad será baja en esos ambientes y los efectos en la fisiología y crecimiento de los álamos serán leves.

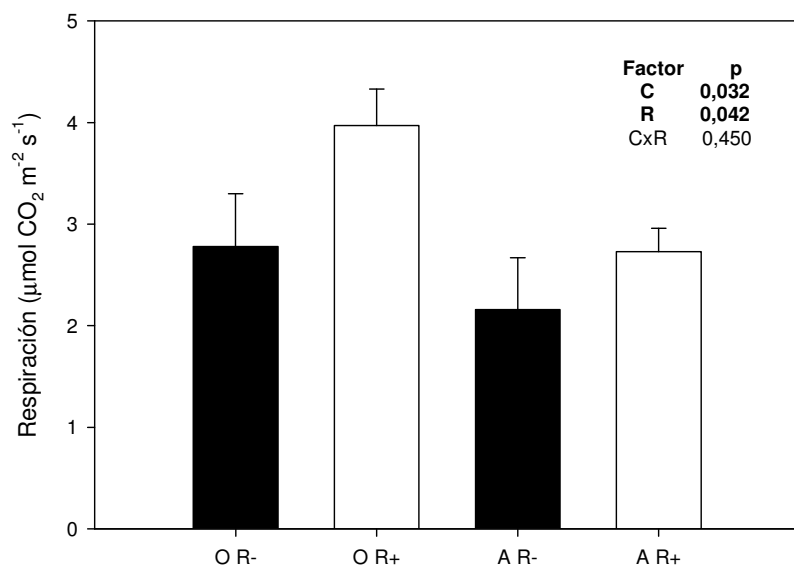
Finalmente, esta tesis aporta una evaluación fisiológica integral del patosistema álamo-roya que incluye evaluaciones a distintas escalas (desde el nivel de hoja hasta plantación) que dan sustento y un marco conceptual a las investigaciones que se realizan a niveles menores de integración (genómica, proteómica y metabolómica).

## **Anexo 1: Figuras complementarias.**

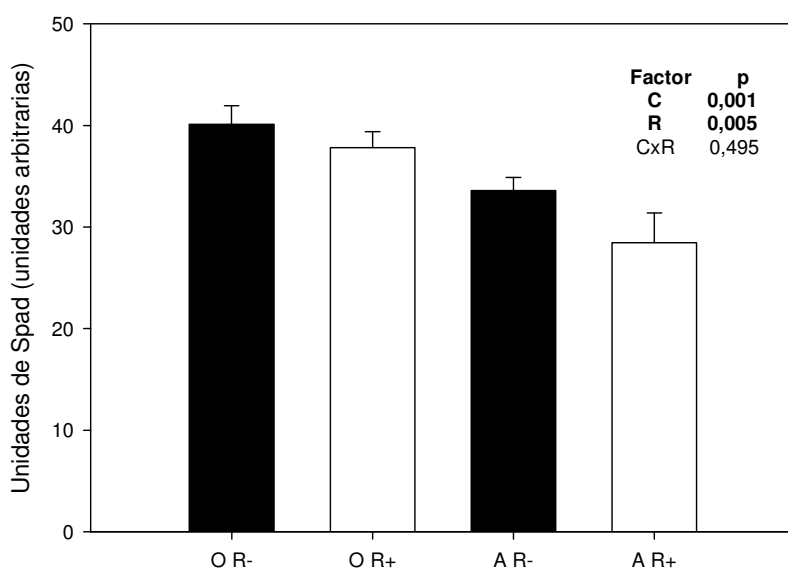


**A1.1- Figuras complementarias al capítulo 3.**

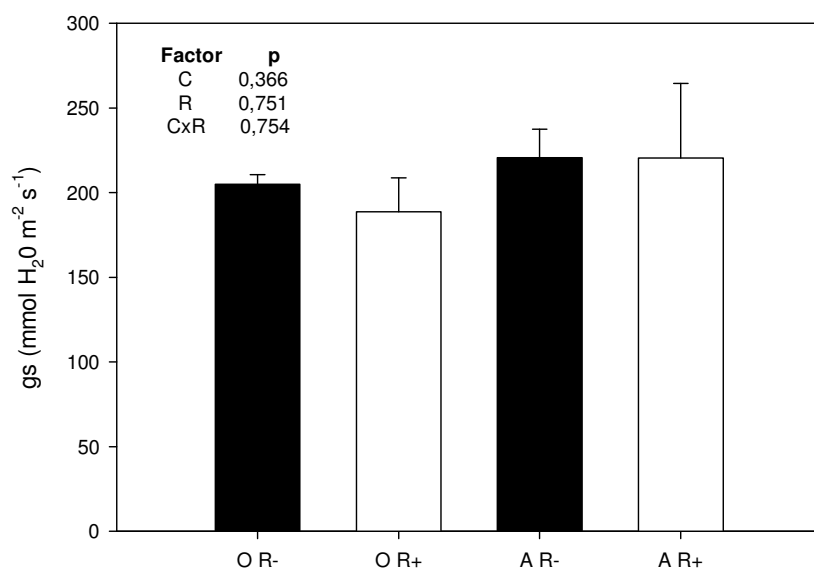
**Figura 1:** Fotosíntesis neta (A sat) de hojas de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 en la temporada 2011-2012 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho del gráfico se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



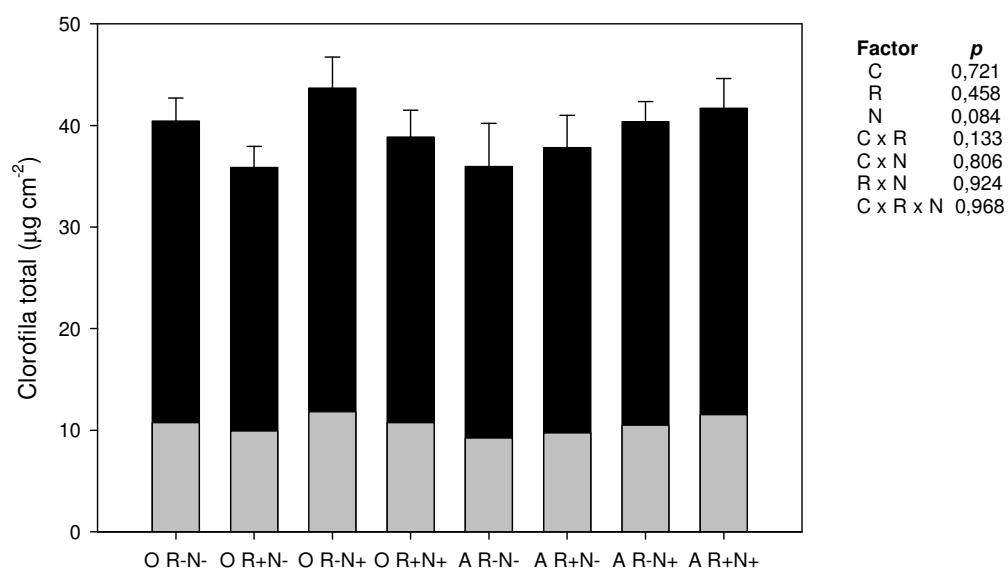
**Figura 2:** Respiración de hojas de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 en la temporada 2011-2012 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho del gráfico se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.



**Figura 3:** Contenido de clorofilas a través de las unidades arbitrarias del Spad de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 en la temporada 2011-2012 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

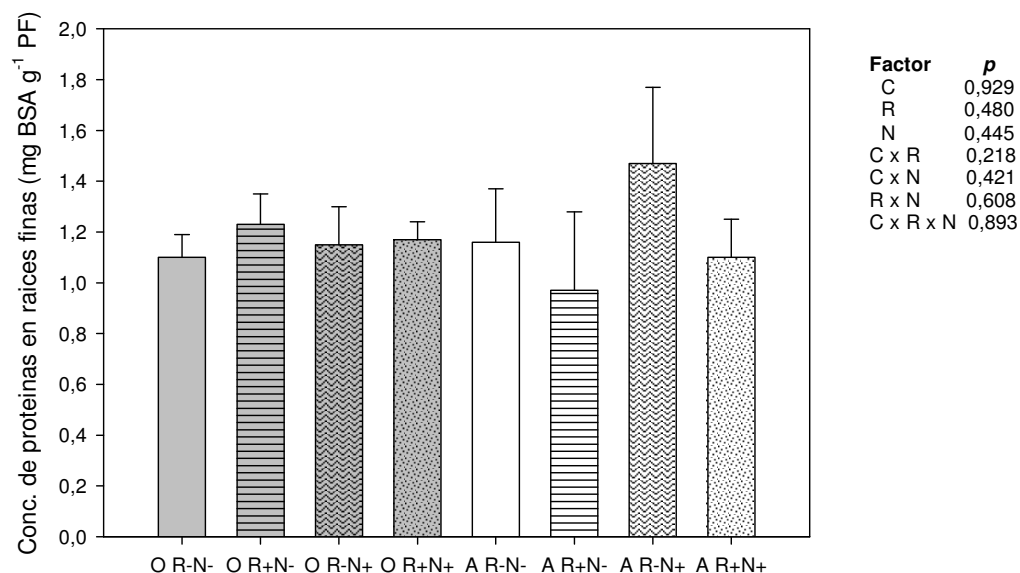


**Figura 4:** Conductancia estomática de la hoja (gs) de los diferentes tratamientos en el ensayo 1 en la temporada 2011-2012 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-). Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltado en negrita los factores estadísticamente significativos.

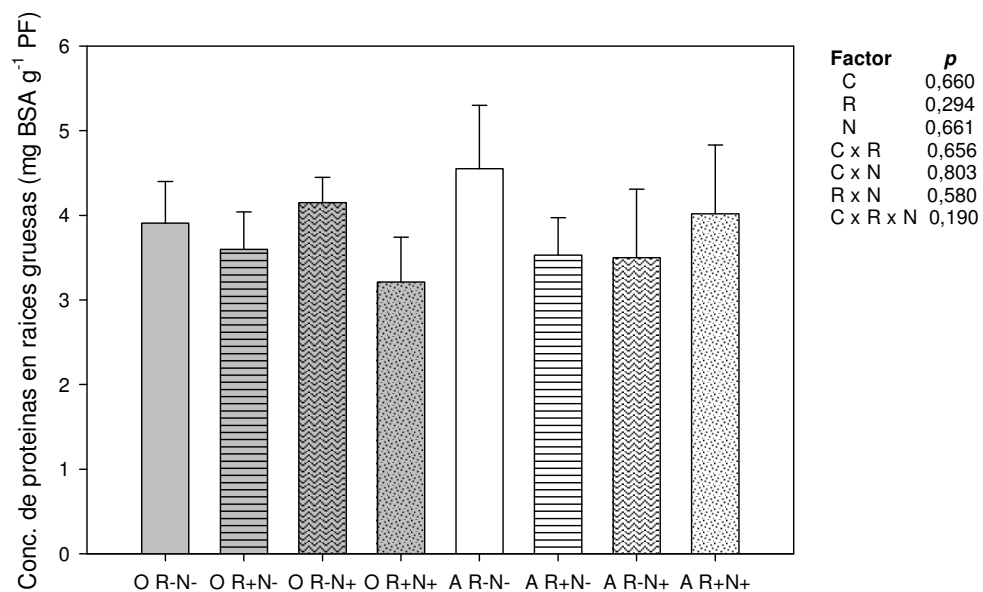


**Figura 5:** Contenido de clorofila total ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) de los diferentes tratamientos del ensayo 2 con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), Clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+), sin roya (R-), con nitrógeno (N+) y sin nitrógeno (N-). En negro se muestra la proporción de clorofila a y en gris la proporción de clorofila b. Sobre el margen superior derecho se observan los valores de p derivados del ANOVA ( $p < 0,05$ ).

#### A1.2- Figuras complementarias al capítulo 4.



**Figura 6:** Concentración de proteínas ( $\text{mg BSA g}^{-1} \text{PF}$ ) en raíces finas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observan los valores de p derivados del ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7:** Concentración de proteínas (mg BSA g<sup>-1</sup> PF) en raíces gruesas para los diferentes tratamientos con sus respectivos errores estándar. Clon Onda (O), clon 'Australiano 106/60' (A), con roya (R+) y sin roya (R-), sin nitrógeno (N-) y con nitrógeno (N+). Sobre el margen superior izquierdo se observan los valores de p derivados del ANOVA (p<0,05).

## **Anexo 2: Metodologías alternativas para la cuantificación de roya.**

## A2.1-Introducción.

La forma de cuantificar el avance de las enfermedades foliares frecuentemente se basa en la observación visual de los signos de la enfermedad o, alternativamente, del avance de los síntomas. Esas formas de cuantificar la enfermedad son subjetivas y requieren gran experiencia por parte del observador para que sean significativas, existiendo la posibilidad de confundir síntomas de estrés abiótico como si fuesen causados por la enfermedad (Ayliffe *et al.*, 2013).

Cuando hablamos de la roya del álamo, el recuento del número de pústulas es el parámetro que suele analizarse para cuantificar el grado de infección (Pei *et al.*, 2003). Sin embargo, este parámetro es afectado por condiciones ambientales como temperatura, luz, humedad, edad de la hoja y presencia de hiperparásitos (Dowkiw *et al.*, 2003). Además, el recuento de pústulas lleva implícito la finalización del ciclo de la enfermedad (Ayliffe *et al.*, 2013). Dicho ciclo comienza con la infección por *Melampsora* sp. a través de los estomas, aunque la penetración directa a través de la cutícula es posible. Pocos días después de la formación de una vesícula subestomática, las hifas ocupan gran parte de la cavidad subestomática (Spiers & Hopcroft, 1988). Posteriormente se produce la aparición en el envés de la hoja de los urediniosoros (pústulas). Por lo tanto, es de esperar que disminuya la tasa fotosintética debido al entorpecimiento en el intercambio gaseoso de la cámara subestomática y al daño a células del mesófilo mucho antes de que aparezcan las pústulas (Spiers & Hopcroft, 1988). Como consecuencia, el número de pústulas probablemente sea un indicador tardío y poco sensible para detectar el grado de infección por roya en plantas que crecen en condiciones de campo (Boyle *et al.*, 2005).

Sin embargo, existe una gran variedad de métodos alternativos para cuantificar el grado de infección, los cuales no han sido probados en las interacciones entre *Populus* sp-*Melamposra* sp. pero sí para otros patosistemas. Estos métodos se basan en la cuantificación de ciertas moléculas que se encuentran en los hongos y no en los tejidos de las hojas.

Una de estas metodologías alternativas es la estimación del grado de infección de la roya a través de la cuantificación de ergosterol. El ergosterol es un componente principal de la membrana celular de los hongos y permite estimar el contenido vivo de masa fúngica, ya que se degrada rápidamente luego de la muerte celular (Lau *et al.*, 2006). La forma más utilizada

para cuantificar el ergosterol es mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección en ultravioleta (Jedlickova *et al.*, 2008) .

Otra forma de cuantificar la roya es a través de la cuantificación de quitina. La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosmina que forma parte de la pared celular de los hongos. El método más utilizado es una digestión fuerte, ácida o alcalina, y la subsecuente medición de la glucosamina producida por colorimetría o HPLC (Ekblad & Nasholm, 1996).

## **A2.2- Objetivo e hipótesis.**

Objetivo 1: Cuantificar el grado de ataque de roya a nivel foliar por métodos alternativos al recuento de número de pústulas, que permitan conocer el grado de infección antes de la visualización de las pústulas.

Hipótesis 1: El recuento del número de pústulas es un indicador tardío del grado de ataque, ya que cuando se visualizan las pústulas el micelio ya se expandió dentro de la cámara subestomática y el mesófilo. La determinación de ergosterol o glucosamina son indicadores más precisos de la infección porque son independientes del ciclo del hongo.

## **A2.3- Materiales y métodos.**

Como paso previo, y aunque los clones de *Populus deltoides* son menos susceptibles a *Septoria musiva* (el agente causal de otra enfermedad de importancia en los álamos, la cancrrosis) se confirmó que el material en estudio estaba libre de este patógeno por observación macroscópica de la sintomatología de esta enfermedad.

Para cuantificar el grado de ataque de roya se tomaron muestras de hojas (discos de 17,5mm de diámetro) con distinto número de pústulas del ensayo 1, de ambos clones. Sobre dichos discos se contó el número de pústulas por unidad de área (mediante el uso de fotografías de gran resolución y del programa Image Tool) y luego se colocaron en freezer a -80°C para posteriormente realizar la determinación de ergosterol mediante HPLC (de Sio *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2007) o para realizar la determinación de quitina por el

método colorimétrico (Aidoo *et al.*, 1981; Ride & Drysdale, 1972). Se adaptaron las metodologías detalladas en los trabajos citados y se llegó a los siguientes protocolos:

Protocolo para la determinación de ergosterol por HPLC:

- Tomar 1 disco (17,5 mm de diámetro) y molerlo en mortero con nitrógeno líquido.
- Homogeneizar con 5 ml de metanol.
- Homogeneizar en vortex durante 1 min.
- Sonicar 1 min.
- Incubar 30 min en agitación.
- Centrifugar a 5000 g, durante 20 min.
- Tomar 3,5 ml del sobrenadante.
- Agregar 1,3 ml KOH (40 g/l en etanol 95 %).
- Agregar 3 ml de hexano e incubar a 70 °C, durante 30 min.
- Agregar 0,8 ml agua y recuperar el hexano (1,8 ml).
- Repetir la extracción 2 veces más y juntar las 3 porciones.
- Evaporar en rotovapor y resuspender en 0,5 ml de metanol.
- Colocar la muestra sobre un cartucho SPE, agregar 5 ml de metanol y recuperar los 3 ml finales.
- Inyectar 40 µl de esos 3 ml en el HPLC.
- La separación se realiza en columna Microspher C18 (Varian) con gradiente de solventes, siguiendo la siguiente corrida a 1 ml por minuto: comenzar con 100 % de solución A (80 % metanol y 20 % agua) para llegar a los 20 min con 50 % de solución A y 50 % de solución B (cloruro de metilo), mantener dicha mezcla hasta el minuto 30, luego 10 minutos con 100 % de solución A.
- La lectura se realiza a 282 nm, con un tiempo de retención de 17 minutos.

Protocolo para la determinación de glucosamina:

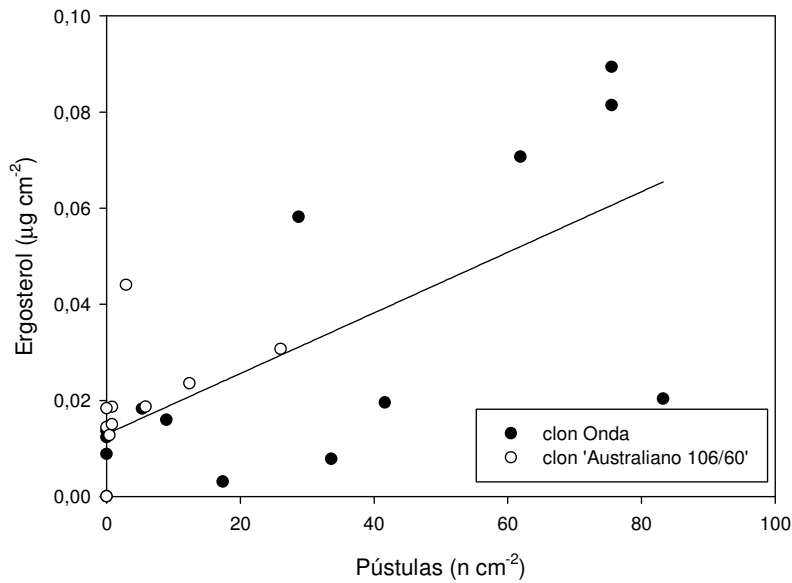
- Tomar 1 disco (17,5 mm de diámetro) y molerlo en nitrógeno líquido.
- Homogeneizar con 5 ml de acetona.
- Centrifugar (durante 10 min, a 1500 g, a 2 °C) y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 10 ml de agua. Centrifugar (durante 10 min, a 1500 g, a 2 °C) y eliminar el sobrenadante.



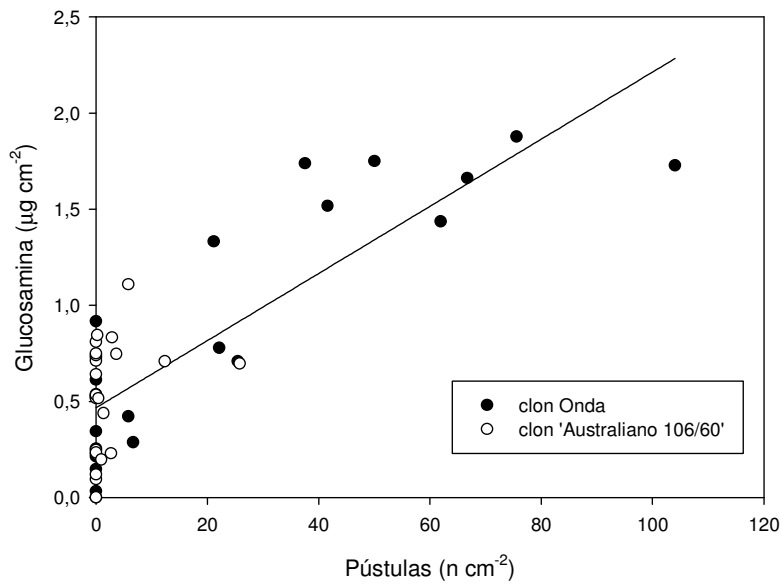
- Agregar 3 ml de KOH y calentar (durante 60 min, a 130 °C). Dejar enfriar.
- Mezclar con 8 ml de etanol 75 % y dejar 15 min en agua helada.
- Agregar 0,9 ml de la suspensión de celite en la parte superior. Centrifugar (durante 10 min, a 1500 g, a 2 °C) y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 8 ml de etanol 40 %. Centrifugar (durante 10 min, a 1500 g, a 2° C) y eliminar el sobrenadante.
- Repetir dos veces más el proceso pero con 8 ml de agua fría.
- El residuo final se diluye 1,5 ml con agua.
- Agregar 1,5 ml de NaNO<sub>2</sub> y 1,5 ml de KHSO<sub>4</sub>, agitar por 15 min y centrifugar (durante 4 min, a 1500 g, a 2 °C).
- Tomar 1,5 ml del sobrenadante.
- Agregar 0,5 ml de NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> y agitar por 5 min.
- Agregar 0,5 ml de MBTH, calentar por 3 min en baño de agua y dejar enfriar.
- Agregar 0,5 ml FeCl<sub>3</sub> y dejar reposar por 30 min.
- Medir a 650nm en el espectrofotómetro.

#### **A2.4- Resultados comentados.**

La correlación para ambos clones entre el número de pústulas y la concentración de ergosterol es positiva y estadísticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ,  $R=0,700$ ) (Figura 1). La correlación entre el número de pústulas y la concentración de glucosamina también es positiva ( $p \leq 0,001$ ,  $R=0,811$ ) (Figura 2). Se puede observar en ambas figuras (más claramente en la Figura 3) que cuando el número de pústulas es 0 la concentración de ergosterol o glucosamina no son constantes, sino que hay una gran variabilidad en la concentración de estos compuestos. Esto nos estaría diciendo que, aunque no se observen las pústulas, el proceso de infección por parte de la roya ya se está desarrollando.



**Figura 1:** Correlación entre número de pústulas (nº de pústulas cm<sup>-2</sup>) y ergosterol (μg cm<sup>-2</sup>) para los clones Onda y 'Australiano 106/60'. R=0,700 y p≤0,001.

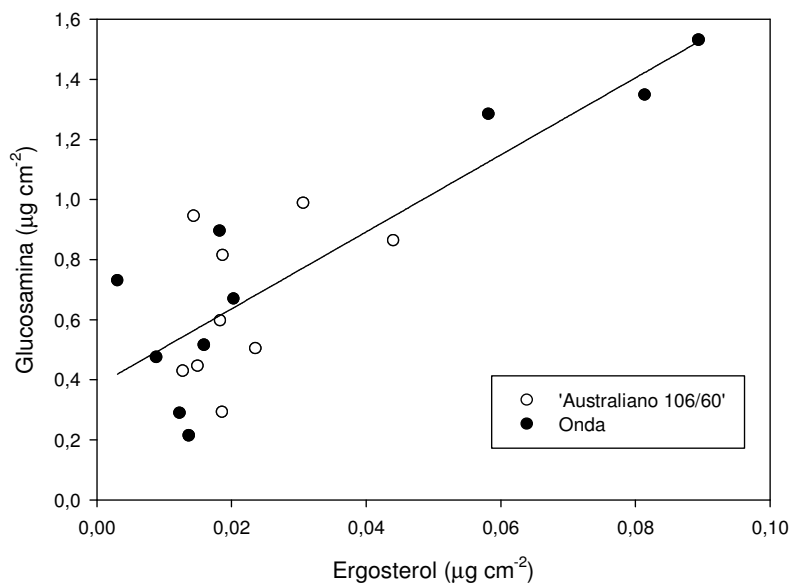


**Figura 2:** Correlación entre número de pústulas (n de pústulas cm<sup>-2</sup>) y glucosamina (μg cm<sup>-2</sup>) para los clones Onda y 'Australiano 106/60'. R=0,811 y p≤0,001.

Por otro lado, cuando analizamos la relación entre los dos componentes del hongo, existe una correlación entre la concentración de ergosterol y la concentración de glucosamina positiva y estadísticamente significativa (p≤0,001, R=0,826) (Figura 3). Esto nos permite suponer que se puede utilizar cualquiera de las metodologías indistintamente. Sin embargo, la

magnitud de los cambios es mayor en la concentración de glucosamina que en la concentración de ergosterol, lo que nos permitiría encontrar diferencias más fácilmente con la determinación de glucosamina, especialmente a niveles bajos de infección.

Además, luego de ajustar ambas técnicas, la determinación de ergosterol es un proceso altamente demandante de tiempo (son necesarias 2 jornadas de 8 horas para determinar 8 muestras) mientras que mediante la determinación de glucosamina se pueden analizar 24 muestras en una jornada.



**Figura 3:** Correlación entre ergosterol ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) y glucosamina ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para los clones Onda y 'Australiano 106/60'.  $R=0,826$  y  $p\leq 0,001$ .

## A2.5- Conclusiones.

Con estos métodos alternativos al conteo de pústulas (determinación de ergosterol o glucosamina) se puede cuantificar el nivel de desarrollo de la masa fúngica antes de que aparezcan las pústulas. Además, nos permiten cuantificar el nivel de la enfermedad de forma objetiva.

Sin embargo, la determinación de ergosterol consume mucho tiempo y la correlación tiene un coeficiente de correlación menor en comparación a la determinación de glucosamina.

En consecuencia, para los objetivos de esta tesis se utilizó la determinación de glucosamina.

## **Capítulo 7: Bibliografía.**

- Achinelli, F.** 2014. Salicáceas en la pampa arenosa y la pampa ondulada: situación actual y perspectivas. Actas de las Jornadas de Salicáceas y IV Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, La Plata, Argentina.
- Achinelli, F.G., E. Baridón, E. Prada, M. Francisco, A. Aparicio & R. Marlats.** 2003. Fertilización de arranque en plantaciones de álamos (*Populus* spp.) de la pampa húmeda argentina. Informaciones Agrónomicas del Cono Sur 20.
- Ahlholm, J.U., M. Helander, S. Lehtimäki, P. Wäli & K. Saikkonen.** 2002. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos* 99(1):173-183.
- Aidoo, K., R. Hendry & B.J.B. Wood.** 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 12(1):6-9.
- Alvarez, J., E. Fernandez Schieder, L. Faustino, C. Graciano & J. Gyence.** 2014. Fluctuación de la napa freática y crecimiento de forestaciones de *Populus deltoides* en un campo endicado y drenado del Bajo Delta del Paraná. Actas de las Jornadas de Salicáceas y IV Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, La Plata, Argentina.
- Alves, A.A., L.M. da Silva Guimaraes, A.R. de Melo Chaves, F.M. DaMatta & A.C. Alfenas.** 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(5):1831-1839.
- Arango, A., G. Hoyos, J. Felipe, C. Vásquez & A. María.** 2001. Variación de la densidad básica de la madera de *Eucalyptus grandis* en arboles de siete años de edad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 54 (1 y 2):1275-1284.
- Ayliffe, M., S.K. Periyannan, A. Feechan, I. Dry, U. Schumann, M.-B. Wang, A. Pryor & E. Lagudah.** 2013. A Simple Method for Comparing Fungal Biomass in Infected Plant Tissues. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(6):658-667.
- Azaiez, A., B. Boyle, V. Levée & A. Séguin.** 2009. Transcriptome Profiling in Hybrid Poplar Following Interactions with *Melampsora* Rust Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(2):190-200.
- Ball, J., J. Carle & A. Del Lungo.** 2005. Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural. *Unasylva* 221(56):3.9.
- Bansal, S., G. Hallsby, M.O. Lafvenius & M.C. Nilsson.** 2013. Synergistic, additive and antagonistic impacts of drought and herbivory on *Pinus sylvestris*: leaf, tissue and whole-plant responses and recovery. *Tree Physiology* 33(5):451-463.
- Bassanezi, R.B., L. Amorim, A.B. Filho & R.D. Berger.** 2002. Gas Exchange and Emission of Chlorophyll Fluorescence during the Monocycle of Rust, Angular Leaf Spot and Anthracnose on Bean Leaves as a Function of their Trophic Characteristics. *Journal of Phytopathology* 150(1):37-47.
- Bassanezi, R.B., L. Amorim, A.B. Filho, B. Hau & R.D. Berger.** 2001. Accounting for photosynthetic efficiency of bean leaves with rust, angular leaf spot and anthracnose to assess crop damage. *Plant Pathology* 50(4):443-452.
- Bejaoui, Z., A. Albouchi, M. Abassi & M.H.E. Aouni.** 2006. Influence d'une hydromorphie modérée ou sévère sur la production de biomasse et les échanges gazeux de plants de peuplier euraméricain. *Canadian Journal of Forest Research* 36(10):2654-2665.
- Berger, S., A.K. Sinha & T. Roitsch.** 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58(15-16):4019-4026.
- Boland, G.J., M.S. Melzer, A. Hopkin, V. Higgins & A. Nassuth.** 2004. Climate change and plant diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26(3):335-350.
- Borodoski, E.D.** 2006. Álamos y sauces en el Delta del Paraná: situación del sector y silvicultura. Actas Jornadas de Salicáceas 2006.

- Boyle, B., R. Hamelin & A. Seguin.** 2005. In Vivo Monitoring of Obligate Biotrophic Pathogen Growth by Kinetic PCR. *Applied and environmental microbiology* 71:1546-1552.
- Brasier, C.M.** 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. For. Sci.* 53(2-3):347-358.
- Carretero, R., M.O. Bancal & D.J. Miralles.** 2011. Effect of leaf rust (*Puccinia triticina*) on photosynthesis and related processes of leaves in wheat crops grown at two contrasting sites and with different nitrogen levels. *European Journal of Agronomy* 35(4):237-246.
- Casaubon, E., G. Cueto, K. Hodara & A. Gonzalez.** 2002. Interacciones entre sitio, plaga y una enfermedad del fuste en una plantación de *Populus deltoides* cv. Catfish-2 en el bajo delta del Río Paraná (Argentina). *Invest. Agr.: Sist. Recur. For* 11.
- Ceballos, D.S.** 2003. El reemplazo de pastizales anegadizos por plantaciones de álamos con suelos drenados en el Bajo Delta del río Paraná: cambios físicos y biogeoquímicos en el suelo y el ecosistema. Tesis de maestría en Recursos Naturales. UBA.
- Cerrillo, T., M.E. Rodríguez, F. Achinelli, G. Doffo & V.M.C. Luquez.** 2013. Do greenhouse experiments predict willow responses to long term flooding events in the field? *Bosque* 34(1):71-79.
- CNA, d.A.** 2012. Informe nacional de la Comisión Nacional del Álamo de Argentina.
- Coleman, M.D., A.L. Friend & C.C. Kern.** 2004. Carbon allocation and nitrogen acquisition in a developing *Populus deltoides* plantation. *Tree Physiology* 24(12):1347-1357.
- Cooke, J.E.K., T.A. Martin & J.M. Davis.** 2005. Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist* 167(1):41-52.
- Cooke, J.E.K. & M. Weih.** 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* 167(1):19-30.
- Cortizo, S.** 2005. Roya del Álamo en el Delta del Paraná. *IDIA XXI* 8:135-138.
- Cortizo, S.** 2014. Efecto de la roya del álamo sobre el crecimiento del año y del rebrote de la siguiente temporada en tres clones con distinta susceptibilidad y arquitectura del canopeo. Tesis de maestría en Producción Vegetal. UBA. 113.
- Cortizo, S., J. Bozzi, C. Graciano & J.J. Guiamet.** 2011. Efecto de la roya sobre el desarrollo de raíces en estaqueros de *Populus deltoides*. *En Actas del III Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, Neuquén, Argentina P.*
- Cortizo, S., V. Mema, C. Graciano, N. Abbiati & J.J. Guiamet.** 2006. Efecto de la roya del álamo sobre el follaje y el crecimiento. *Actas de las I Jornadas Argentinas de Salicáceas, Buenos Aires, Argentina:207-214.*
- Cortizo, S. & S. Monteverde.** 2011. Nuevos genotipos para diversificar las plantaciones de álamo del Delta del Paraná. Resultados de un ensayo comparativo clonal. *Actas del III Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, Neuquén, Argentina.*
- Cortizo, S. & S. Romero.** 2000. An overview of *Melampsora* attack in Argentina. *En Proceedings of the 21th Session of the International Poplar Commission. Poplar and Willow Culture: Meeting the Needs of Society and Environment P.*
- Coyle, D.R., M.D. Coleman, J.A. Durant & L.A. Newman.** 2006. Multiple factors affect pest and pathogen damage on 31 *Populus* clones in South Carolina. *Biomass and Bioenergy* 30(8):759-768.
- Cheng, L. & L.H. Fuchigami.** 2002. Growth of young apple trees in relation to reserve nitrogen and carbohydrates. *Tree Physiology* 22(18):1297-1303.
- Danielsen, L., G. Lohaus, A. Sirrenberg, P. Karlovsky, C. Bastien, G. Pilate & A. Polle.** 2013. Ectomycorrhizal Colonization and Diversity in Relation to Tree Biomass and Nutrition in a Plantation of Transgenic Poplars with Modified Lignin Biosynthesis. *PLoS ONE* 8(3):e59207.
- Danielsen, L. & A. Polle.** 2014. Poplar nutrition under drought as affected by ectomycorrhizal colonization. *Environmental and Experimental Botany* 108(0):89-98.
- Das, M.K., C.A. Griffey, R.E. Baldwin, C.M. Waldenmaier, M.E. Vaughn, A.M. Price & W.S. Brooks.** 2007. Host resistance and fungicide control of leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley

- (*Hordeum vulgare*) and effects on grain yield and yield components. *Crop Protection* 26(9):1422-1430.
- de Sio, F., B. Laratta, A. Giovane, L. Quagliuolo, D. Castaldo & L. Servillo.** 2000. Analysis of Free and Esterified Ergosterol in Tomato Products. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(3):780-784.
- DeBell, D.S., R. Singleton, C. Harrington & B.L. Gartner.** 2002. Wood density and fiber length in young *Populus* stems: relation to clone, age, growth rate, and pruning. *Wood and Fiber Science* 34:529-539.
- Desprez-Loustau, M.-L., B. Marçais, L.-M. Nageleisen, D. Piou & A. Vannini.** 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* 63(6):597-612.
- Desprez-Loustau, M.-L., G. Saint-Jean, B. Barrès, C.F. Dantec & C. Dutech.** 2014. Oak powdery mildew changes growth patterns in its host tree: host tolerance response and potential manipulation of host physiology by the parasite. *Annals of Forest Science* 71(5):563-573.
- Dickmann, D.I.** 2001. An overview of the genus *Populus*. En: *Poplar culture in north America* pp. 1-42.
- Dowkiw, A., C. Husson, P. Frey, J. Pinon & C. Bastien.** 2003. Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology* 93(4):421-427.
- Du, K., L. Xu, H. Wu, B. Tu & B. Zheng.** 2012. Ecophysiological and morphological adaption to soil flooding of two poplar clones differing in flood-tolerance. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207(2):96-106.
- Eckenwalder, J.** 1996. Systematics and evolution of *Populus*. . En: *Biology of Populus and its implications for management and Conservation*, Stettler, R., H. Bradshaw, P.E. Heilman & T. Hinckley (eds.). NRC Research Press pp. 7-32.
- Effler, R.S. & R.A. Goyer.** 2006. Baldcypress and water tupelo sapling response to multiple stress agents and reforestation implications for Louisiana swamps. *Forest Ecology and Management* 226:330-340.
- Ekblad, A. & T. Nasholm.** 1996. Determination of chitin in fungi and mycorrhizal roots by an improved HPLC analysis of glucosamine. *Plant and Soil* 178(1):29-35.
- Erbilgin, N., D.A. Galvez, B. Zhang & A. Najar.** 2014. Resource availability and repeated defoliation mediate compensatory growth in trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *PeerJ* 2:e491.
- Erickson, J.E., G.R. Stanosz & E.L. Kruger.** 2004. Photosynthetic consequences of *Marssonina* leaf spot differ between two poplar hybrids. *New Phytologist* 161(2):577-583.
- Evans, J.R.** 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78(1):9-19.
- Fernández Valiela, M.V.** 1979. Introducción a la Fitopatología. Vol. 4-Hongos y Micoplasmas. Colección Científica del INTA, Argentina.
- Formento, N.** 2010. Enfermedades foliares reemergentes del cultivo de maíz: royas (*Puccinia sorghi* y *Puccinia polysora*), tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y mancha ocular (*Kabatiella zae*). INTA. Actualización Técnica.
- Fournier, M., J. Dlouhá, G. Jaouen & T. Almeras.** 2013. Integrative biomechanics for tree ecology: beyond wood density and strength. *Journal of Experimental Botany* 64(15):4793-4815.
- Francis, R.A., A.M. Gurnell, G.E. Petts & P.J. Edwards.** 2005. Survival and growth responses of *Populus nigra*, *Salix elaeagnos* and *Alnus incana* cuttings to varying levels of hydric stress. *Forest Ecology and Management* 210:291-301.
- Frey, P., P. Gérard, N. Feau, C. Husson & J. Pinon.** 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. En: *Rust diseases of willow and poplar*, Ming, H.P. & A. McCracken (eds.). CABI pp. 63-72.



- Gieger, T. & F.M. Thomas.** 2002. Effects of defoliation and drought stress on biomass partitioning and water relations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Basic and Applied Ecology* 3(2):171-181.
- Gill, R.A. & R.B. Jackson.** 2000. Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 147(1):13-31.
- Golfari, L.** 1958. Condiciones ecológicas del cultivo de las Salicáceas en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas* 12(2):173-243.
- González, E., E. Muller, F.A. Comán & M. González-Sanchis.** 2010. Leaf nutrient concentration as an indicator of *Populus* and *Tamarix* response to flooding. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12(4):257-266.
- González, M. & E. García.** 1996. Evaluación de las pérdidas por roya en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en diferentes épocas de siembra en Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 7(1):95-98.
- Goyal, G.C., J.J. Fisher, M.J. Krohn, R.E. Packwood & J.R. Olson.** 1999. Variability in pulping and fiber characteristics of hybrid poplar trees due to their genetic makeup, environmental factors, and tree age. *TAPPI J* 82.
- Graciano, C., J.F. Goya & J.L. Frangi.** 2006. Chapter 2: Eucalyptus grandis plantations in Argentina in the context of sustainable silviculture. *Forest Ecology Research Horizons*:36.
- Green, A.J., G. Berger, C.A. Griffey, R. Pitman, W. Thomason & M. Balota.** 2014. Genetic resistance to and effect of leaf rust and powdery mildew on yield and its components in 50 soft red winter wheat cultivars. *Crop Protection* 64:177-186.
- Harvey, H.P. & R. van den Driessche.** 1999. Poplar nutrient resorption in fall or drought: influence of nutrient status and clone. *Canadian Journal of Forest Research* 29(12):1916-1925.
- Herre, E.A., S.A. Van Bael, Z. Maynard, N. Robbins, J. Bischoff, A.E. Arnold, E. Rojas, L.C. Mejia, R.A. Cordero & C. Woodward.** 2005. Tropical plants as chimera: some implications of foliar endophytic fungi for the study of host plant defense, physiology, and genetics. *Biotic interactions in the tropics*:226-240.
- Honorato Júnior, J., L. Zambolim, C.E. Aucique-Pérez, R.S. Resende & F.A. Rodrigues.** 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123:31-39.
- Huang, X., X. Xiao, S. Zhang, H. Korpelainen & C. Li.** 2009. Leaf morphological and physiological responses to drought and shade in two *Populus cathayana* populations. *Biologia Plantarum* 53(3):588-592.
- Inskip, W.P. & P.M. Bloom.** 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiology* 77:483-485.
- Ivancovich, A. & G. Botta.** 2003. Roya de la soja en la Argentina. INTA Rafaela Información técnica de cultivos de verano. Campaña 2003. Publicación miscelánea N 100.
- Jedlickova, L., D. Gadas, P. Havlová & J. Havel.** 2008. Determination of ergosterol levels in barley and malt varieties in the czech republic via HPLC. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(11):4092-4095.
- Jensen, B. & L. Munk.** 1997. Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f.sp. hordei on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathology* 46(2):191-202.
- Johnson, G.R., A.T. Grotta, B.L. Gartner & G. Downes.** 2005. Impact of the foliar pathogen Swiss needle cast on wood quality of Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 35(2):331-339.
- Johnson, N.C., J.H. Graham & F.A. Smith.** 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135(4):575-585.
- Karacic, A. & M. Weih.** 2006. Variation in growth and resource utilisation among eight poplar clones grown under different irrigation and fertilisation regimes in Sweden. *Biomass and Bioenergy* 30(2):115-124.

- Keskitalo, J., G. Bergquist, P. Gardestrom & S. Jansson.** 2005. A Cellular Timetable of Autumn Senescence. *Plant Physiology* 139(4):1635-1648.
- Killingbeck, K.T.** 1996. Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* 77(6):1716-1727.
- Klašnja, B., S. Orlovi, Z. Gali, M. Dreki, V. Vasi & A. Pilipovi.** 2008. Poplar biomass of high density short rotation plantations as raw material for energy production. *Wood Research* 53(2):27-38.
- Kneip, C., P. Lockhart, C. Vob & U.-G. Maier.** 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes-new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7(1):55.
- Kosola, K.R., D.I. Dickmann, E.A. Paul & D. Parry.** 2001. Repeated insect defoliation effects on growth, nitrogen acquisition, carbohydrates, and root demography of poplars. *Oecologia* 129(1):65-74.
- Kozlowsky, T.T.** 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph* 1.
- Kreuzwieser, J., S. Fürniss & H. Rennenberg.** 2002. Impact of waterlogging on the N-metabolism of flood tolerant and non-tolerant tree species. *Plant, Cell & Environment* 25(8):1039-1049.
- La Porta, N., P. Capretti, I.M. Thomsen, R. Kasanen, A.M. Hietala & K. Von Weissenberg.** 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30(2):177-195.
- Langheinrich, U. & R. Tischner.** 1991. Vegetative Storage Proteins in Poplar : Induction and Characterization of a 32- and a 36-Kilodalton Polypeptide. *Plant Physiology* 97(3):1017-1025.
- Larjavaara, M. & H.C. Muller-Landau.** 2010. Rethinking the value of high wood density. Rethinking the value of high wood density. *Functional Ecology* 24(4):701-705.
- Lau, A.P.S., A.K.Y. Lee, C.K. Chan & M. Fang.** 2006. Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment* 40(2):249-259.
- Laurans, F. & G. Pilate.** 1999. Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology* 89(3):233-238.
- Lehtonen, P., M. Helander & K. Saikkonen.** 2005. Are endophyte-mediated effects on herbivores conditional on soil nutrients? *Oecologia* 142(1):38-45.
- Li, J., T. Dong, Q. Guo & H. Zhao.** 2014. *Populus deltoides* females are more selective in nitrogen assimilation than males under different nitrogen forms supply. *Trees*:1-17.
- Lopes, D.B. & R.D. Berger.** 2001. The Effects of Rust and Anthracnose on the Photosynthetic Competence of Diseased Bean Leaves. *Phytopathology* 91(2):212-220.
- López Ritas, J. & J. López Mélida.** 1990. El diagnóstico de suelos y plantas (métodos de campo y laboratorio). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Luquez, M.V., F. Achinelli & S. Cortizo.** 2012. Evaluation of flooding tolerance in cuttings of *Populus* clones used for forestation at the Paraná River Delta, Argentina. *Southern Forests* 74:61-70.
- Ma, Y., J. He, C. Ma, J.I.E. Luo, H. Li, T. Liu, A. Polle, C. Peng & Z.-B. Luo.** 2014. Ectomycorrhizas with *Paxillus involutus* enhance cadmium uptake and tolerance in *Populus × canescens*. *Plant, Cell & Environment* 37(3):627-642.
- Major, I., M.-C. Nicole, S. Duplessis & A. Seguin.** 2010. Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynthesis Research* 104(1):41-48.
- Mandal, K., R. Saravanan, S. Maiti & I.L. Kothari.** 2009. Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116(4):164.
- Marcais, B. & M.-L. Desprez-Loustau.** 2013. European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Annals of Forest Science* 71(6):633-642.

- Marron, N., E. Dreyer, E. Boudouresque, D. Delay, J.-M. Petit, F.M. Delmotte & F. Brignolas.** 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa\_Avanzo'. *Tree Physiology* 23(18):1225-1235.
- May De Mio, L.L., L. Amorim & L.M. Moreira.** 2006. Progreso de epidemias e avaliacao de danos da ferrugem em clones de Alamo. *Fitopatologia Brasileira* 31:133-139.
- May De Mio, L.L. & L. Ruaro.** 2008. Métodos de avaliacao da ferrugem do álamo e eficiencia de fungicidas no seu controle. *Revista Árvore* 32:837-844.
- Mayr, S., C. Siller, M. Kriss, W. Oberhuber & H. Bauer.** 2001. Photosynthesis in rust-infected adult Norway spruce in the field. *New Phytologist* 151(3):683-689.
- Melcher, P.J., N. Michele Holbrook, M.J. Burns, M.A. Zwieniecki, A.R. Cobb, T.J. Brodribb, B. Choat & L. Sack.** 2012. Measurements of stem xylem hydraulic conductivity in the laboratory and field. *Methods in Ecology and Evolution* 3(4):685-694.
- Mir, S.G.L., E.E. Rangel, H.E.V. Mir & J.H. Espino.** 2004. Pérdidas Ocasionadas por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Eriks. y Henn. Causante de la Roya del Tallo en Seis Cultivares de Avena (*Avena sativa* L.) en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2):166-171.
- Miranda, M., S.G. Ralph, R. Mellway, R. White, M.C. Heath, J.r. Bohlmann & C.P. Constabel.** 2007. The Transcriptional Response of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to Infection by *Melampsora medusae* Leaf Rust Involves Induction of Flavonoid Pathway Genes Leading to the Accumulation of Proanthocyanidins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(7):816-831.
- Monclus, R., E. Dreyer, M. Villar, F.M. Delmotte, D. Delay, J.-M. Petit, C. Barbaroux, D. Le Thiec, C. Bréchet & F. Brignolas.** 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* 169(4):765-777.
- Monteoliva, S. & G. Senisterra.** 2008. Efecto del sitio, el origen y el clon sobre el crecimiento y propiedades de la madera de *Populus*. *Investigación Agraria. Sistemas y recursos forestales* 17(3):261-270.
- Monteverde, S. & S. Cortizo.** 2014. Hibridaciones intra e interespecíficas: avances en la obtención de variabilidad genética del Programa de Mejoramiento de Álamo de INTA. VI Reunión GEMFO:32-36.
- Moulinier, J., F. Lorenzetti & Y. Bergeron.** 2014. Growth and mortality of trembling aspen (*Populus tremuloides*) in response to artificial defoliation. *Acta Oecologica* 55(0):104-112.
- Muller, A., K. Volmer, M. Mishra-Knyrim & A. Polle.** 2013. Growing poplars for research with and without mycorrhizas. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Nasir, M., S.M. Mughal, T. Mukhtar & M.Z. Awan.** 2014. Powdery mildew of mango: A review of ecology, biology, epidemiology and management. *Crop Protection* 64(0):19-26.
- Newcombe, G. & G.A. Chastagner.** 1993. A leaf rust epidemic of hybrid poplar along the lower Columbia River caused by *Melampsora medusae*. *Plant Disease;(United States)* 77(5).
- Newcombe, G., B. Stirling, S. McDonald & H.D. Bradshaw.** 2000. *Melampsora x columbiana*, a natural hybrid of *M. medusae* and *M. occidentalis*. *Mycological Research* 104(03):261-274.
- Newsham, K.K., A.H. Fitter & A.R. Watkinson.** 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution* 10(10):407-411.
- Niinemets, U.** 2010. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260(10):1623-1639.
- Nosetti, M.J. & N. Naves.** 2013. La potencialidad de la producción forestal bajo riego. *Producción Forestal*:12-13.
- Parniske, M.** 2000. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology* 3(4):320-328.

- Paszkowski, U.** 2006. Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* 9(4):364-370.
- Pei, M.H., C. Ruiz, J. Harris & T. Hunter.** 2003. Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. *European journal of plant pathology* 109(3):269-276.
- Pei, M.H. & Y.H. Shang.** 2005. A brief summary of *Melampsora* species on *Populus*. En: *Rust diseases of willow and poplar* pp. 51-61.
- Peng, Y., Y. Dong, B. Tu, Z. Zhou, B. Zheng, L. Luo, C. Shi & K. Du.** 2013. Roots play a vital role in flood-tolerance of poplar demonstrated by reciprocal grafting. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208:479-487.
- Pfabel, C., K.-U. Eckhardt, C. Baum, C. Struck, P. Frey & M. Weih.** 2012. Impact of ectomycorrhizal colonization and rust infection on the secondary metabolism of poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*). *Tree Physiology* 32(11):1357-1364.
- Pinon, J. & P. Frey.** 1997. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *European journal of plant pathology* 103(2):159-173.
- Pla, M. & L.A. Caro.** 2006. Caracterización de la productividad en una plantación de *Populus x canadensis* 'Conti 12' bajo riego por gravedad. *Actas de las I Jornadas Argentinas de Salicáceas*, Buenos Aires, Argentina.
- Pliura, A., S. Zhang, J. Bousquet & J. Mackay.** 2006. Age trends in genotypic variation of wood density and its intra-ring components in young poplar hybrid crosses. *Annals of Forestry Science* 63(7):673-685.
- Ploetz, R.C. & B. Schaffer.** 1989. Effects of flooding and *Phytophthora* root rot on net gas exchange and growth of avocado. *Phytopathology* 79(2):204-208.
- Raghavendra, A.K.H. & G. Newcombe.** 2012. The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora* rust. *New Phytologist* 197(3):909-918.
- Ragonezze, A.E., F. Rial Alberti, R.G. Ciocchini & A. García.** 1987. Fitotecnia de Salicáceas en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias Castelar (INTA). *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, XLI.
- Redman, R.S., D.D. Dunigan & R.J. Rodriguez.** 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151(3):705-716.
- Rennenberg, H., H. Wildhagen & B. Ehling.** 2010. Nitrogen nutrition of poplar trees. *Plant Biology* 12(2):275-291.
- Ride, J.P. & R.B. Drysdale.** 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* 2(1):715.
- Rinaldi, C., A. Kohler, P. Frey, F. Duchaussoy, N. Ningre, A. Couloux, P. Wincker, D. Le Thiec, S. Fluch & F. Martin.** 2007. Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology* 144:347-366.
- Robert, C., M.-O. Bancal & C. Lannou.** 2002. Wheat Leaf Rust Uredospore Production and Carbon and Nitrogen Export in Relation to Lesion Size and Density. *Phytopathology* 92(7):762-768.
- Robert, C., M.-O. Bancal & C. Lannou.** 2004. Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 94(7):712-721.
- Robert, C., M.-O. Bancal, B. Ney & C. Lannou.** 2005. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist* 165(1):227-241.
- Rodriguez, M.E.** 2014. Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la inundación en álamo (*Populus* spp.). Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Rubio, A., V. Loetti & I. Bellocq.** 2013. Effect of defoliation intensity and timing on the growth of *Populus alba* and *Salix babylonica* x *Salix alba*. *Bosque (Valdivia)* 34:353-358.
- Salisbury, F.B. & C.W. Ross.** 2000. Fisiología de las plantas. Thomson-Paraninfo.

- Sardans, J. & J. Peñuelas.** 2007. Drought changes phosphorus and potassium accumulation patterns in an evergreen Mediterranean forest. *Functional Ecology* 21(2):191-201.
- Schardl, C.L.** 2010. The epichloae, symbionts of the grass subfamily Pooideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*:646-665.
- Senisterra, G.E., M.G. Ducid, F.J. Gaspari & M.I. Delgado.** 2011. Evaluación de clones de *Populus* spp., a los dos años de edad, en dos micrositios de la región pampeana, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* 43(2):133-144.
- Silla, F. & A. Escudero.** 2004. Nitrogen-use efficiency: trade-offs between N productivity and mean residence time at organ, plant and population levels. *Functional Ecology* 18(4):511-521.
- Siwecki, R. & K. Przyby.** 1981. Water relations in the leaves of poplar clones resistant and susceptible to *Melampsora larici-populina*. *European Journal of Forest Pathology* 11(5-6):348-357.
- Spiers, A.G. & D.H. Hopcroft.** 1988. Penetration and infection of poplar leaves by urediniospores of *Melampsora larici-populina* and *Melampsora medusae*. *New Zealand Journal of Botany* 26(1):101-111.
- Spiers, A.G. & D.H. Hopcroft.** 1994. Comparative studies of the poplar rusts *Melampsora medusae*, *M. larici-populina* and their interspecific hybrid *M.medusae-populina*. *Mycological Research* 98(8):889-903.
- Steenackers, J., M. Steenackers, V. Steenackers & M. Stevens.** 1996. Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass and Bioenergy* 10(5-6):267-264.
- Stevens, M., A. Gusse & R. Lindroth.** 2014. Root Chemistry in *Populus tremuloides*: Effects of Soil Nutrients, Defoliation, and Genotype. *Journal of Chemical Ecology* 40(1):31-38.
- Stromberg, J.C.** 1997. Growth and survivorship of fremont cottonwood, goodding willow and salt cedar seedling after large flood in central Arizona. *The great basin naturalist* 57(3):198-208.
- Tabor, G.M., T.L. Kubisiak, N.B. Klopfenstein, R.B. Hall & H.S.M. McNabb.** 2000. Bulk Segregant Analysis Identifies Molecular Markers Linked to *Melampsora medusae* Resistance in *Populus deltoides*. *Phytopathology* 90(9):1039-1042.
- Tavernier, V., S. Cadiou, K. Pageau, R. Laugé, M. Reisdorf-Cren, T. Langin & C. Masclaux-Daubresse.** 2007. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* 58(12):3351-3360.
- Thomas, E. & S. Cortizo.** 2014. Nuevos genotipos de *Populus* permitirán aumentar la disponibilidad de clones para forestar en los valles del norte de la Patagonia. *En Actas de las Jornadas de Salicáceas y IV Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina, La Plata, Argentina.* P.
- Thomas, E. & A. Garcés.** 2011. Crecimiento inicial de 13 clones de álamo en el Valle Medio del río Negro. *Tercer Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina.*
- Toome, M., K. Heinsoo, M. Ramstedt & A. Luik.** 2009. Rust severity in bioenergy willow plantations treated with additional nutrients. *Forest Pathology* 39(1):28-34.
- Tschaplinski, T.J., G.A. Tuskan, G.M. Gebre & D.E. Todd.** 1998. Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiology* 18(10):653-658.
- Van Den Berg, F., C. Robert, M.W. Shaw & F. Van Den Bosch.** 2007. Apical leaf necrosis and leaf nitrogen dynamics in diseased leaves: a model study. *Plant Pathology* 56(3):424-436.
- Vannini, A. & R. Valentini.** 1994. Influence of water relations on *Quercus cerris* - *Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parasite. *Tree Physiology* 14(2):129-139.
- Velez-Martinez, H., J. Lopez-Rosa & G.F. Freytag.** 1989. Determination of yield loss caused by rust [*Uromyces phaseoli* (Reben) Wint.] in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Puerto Rico. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop* 32:134-135.

- Vergutz, L., S. Manzoni, A. Porporato, R.F. Novais & R.B. Jackson.** 2012. Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants. *Ecological Monographs* 82(2):205-220.
- Verma, B., R.D. Robarts & J.V. Headley.** 2003. Seasonal Changes in Fungal Production and Biomass on Standing Dead *Scirpus lacustris* Litter in a Northern Prairie Wetland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2):1043-1050.
- Vialle, A., N. Feau, P. Frey, L. Bernier & R.C. Hamelin.** 2013. Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66(3):628-644.
- Voegelé, R.T. & K. Mendgen.** 2003. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist* 159(1):93-100.
- Vrancken, K., M. Holtappels, H. Schoofs, T. Deckers & R. Valcke.** 2013. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art. *Microbiology* 159:823.
- Vreugdenhil, S.J., K. Kramer & T. Pelsma.** 2006. Effects of flooding duration, frequency and depth on the presence of saplings of six woody species in north-west Europe. *Forest Ecology and Management* 236(1):47-55.
- Wan, Z., Y. Li, Y. Chen, X. Zhang, H. Guan & T. Yin.** 2013. *Melampsora larici-populina*, the main rust pathogen, causes loss in biomass production of black cottonwood plantations in the south of China. *Phytoparasitica* 41(3):337-344.
- Wang, J.R., A.L. Zhong, P. Comeau, M. Tsze & J.P. Kimmins.** 1995. Aboveground biomass and nutrient accumulation in an age sequence of aspen (*Populus tremuloides*) stands in the Boreal White and Black Spruce Zone, British Columbia. *Forest Ecology and Management* 78:127-138.
- Wargo, P.M.** 1996. Consequences of environmental stress on oak: predisposition to pathogens. *Annales des sciences forestieres* 53(2-3):359-368.
- Widin, K.D. & A.L. Schipper.** 1981. Effect of *Melampsora medusae* leaf rust infection on yield of hybrid poplars in the north-central United States. *European Journal of Forest Pathology* 11(7):438-448.
- Xu, X., F.A.N. Yang, X. Xiao, S. Zhang, H. Korpelainen & C. Li.** 2008. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant, Cell & Environment* 31(6):850-860.
- Yin, C., B. Duan, X. Wang & C. Li.** 2004. Morphological and physiological responses of two contrasting Poplar species to drought stress and exogenous abscisic acid application. *Plant Science* 167(5):1091-1097.
- Yin, C., X. Pang & K. Chen.** 2009. The effects of water, nutrient availability and their interaction on the growth, morphology and physiology of two poplar species. *Environmental and Experimental Botany* 67(1):196-203.
- Yin, C., X. Wang, B. Duan, J. Luo & C. Li.** 2005. Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. *Environmental and Experimental Botany* 53(3):315-322.
- Yuan, J.-P., J.-H. Wang, X. Liu, H.-C. Kuang & S.-Y. Zhao.** 2007. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chemistry* 105(4):1755-1759.
- Zhang, S., S. Lu, X. Xu, H. Korpelainen & C. Li.** 2009. Changes in antioxidant enzyme activities and isozyme profiles in leaves of male and female *Populus cathayana* infected with *Melampsora larici-populina*. *Tree Physiology* 30(1):116-128.
- Zhang, X., R. Zang & C. Li.** 2004. Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Science* 166(3):791-797.
- Zhao, D., N.C. Glynn, B. Glaz, J.C. Comstock & S. Sood.** 2011. Orange Rust Effects on Leaf Photosynthesis and Related Characters of Sugarcane. *Plant Disease* 95(6):640-647.

---

Ing. Ftal. Fermín Gortari

---

Dra. Corina Graciano

---

Dr. Juan José Guiamet